

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Martina Bartošová

NADP-dehydrogenasy léčivých rostlin

NADP-dehydrogenases of medicinal plants

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Veronika Doubnerová, Ph.D.

Praha, 2012

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

Podpis:

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Veronice Doubnerové, Ph.D. za ochotu, trpělivost, cenné připomínky a čas, který mi věnovala při vypracování této bakalářské práce. Za odborné rady bych také ráda poděkovala Doc. RNDr. Heleně Ryšlavé, CSc. Na závěr bych ráda poděkovala svým rodičům Aleně a Michalovi Bartošovým za podporu během celého studia.

Abstrakt

Léčivé rostliny obvykle obsahují různé metabolity tvořené sekundárními biosyntetickými drahami, jako je např. fenypropanoidní a šikimátová dráha závisící na dostupnosti NADPH. V této práci byla v 10 léčivých rostlinách běžně dostupných v České republice vedle obsahu celkových fenolických látek a flavonoidů rovněž sledována aktivita enzymů poskytujících NADPH. Jednalo se o glukosa-6-fosfátdehydrogenasu (G6PDH, EC 1.1.1.49), NADP-isocitrátdehydrogenasu (NADP-ICDH, EC 1.1.1.42), NADP-malátdehydrogenasu (oxalacetát dekarboxylační) (NADP-ME, z anglického NADP-malic enzyme, EC 1.1.1.40). Dále byla stanovována aktivita hlavního enzymu šikimátové dráhy šikimátdehydrogenasy (SDH, EC 1.1.1.25). Pro jednotlivá stanovení byly optimalizovány způsoby extrakce. Vhodným zdrojem NADP-dependentních enzymů je ředkev (*Raphanus sativus* L. var. *niger*), česnek (*Allium sativum* L.) a máta peprná (*Mentha piperita* L.). Nejvyšší obsah fenolických látek a flavonoidů byl zjištěn v šalvěji (*Salvia officinalis*), meduňce (*Melissa officinalis* L.) a mátě citronové (*Mentha citrata*). Methanolová extrakce byla pro extrakci těchto látek účinnější než extrakce horkou vodou. Další extrakční postupy a studie jsou však nutné pro charakterizaci jednotlivých látek a principů jejich působení.

Klíčová slova: léčivé rostliny, NADP-dependentní enzymy, fenolické látky, flavonoidy

Abstract

Medicinal plants usually contain metabolites formed by secondary biosynthetic pathways for example phenylpropanoid and shikimate pathway, which depend on NADPH availability. In this work total content of phenolic compounds and flavonoids was determined in 10 medicinal plants common for Czech Republic. Activity of enzymes providing NADPH was determined as well. These enzymes were glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH, EC 1.1.1.49), NADP-isocitrate dehydrogenase (NADP-ICDH, EC 1.1.1.42), NADP-malic enzyme (oxalacetate decarboxylating) (NADP-ME, EC 1.1.1.40). The activity of shikimate dehydrogenase (SDH, EC 1.1.1.25), the main enzyme of shikimate pathway, was also determined. Extraction methods were optimized for each assessment. Applicable source for NADP-dependent enzymes are black radish (*Raphanus sativus* L. var. *niger*), garlic (*Allium sativum* L.) and mint (*Mentha piperita* L.). The highest content of phenolic compounds and flavonoids was determined in sage (*Salvia officinalis*), lemon balm (*Melissa officinalis* L.) and *Mentha citrata*. Extraction with methanol was more effective than extraction with hot water. More extraction methods and studies are necessary for characterization of individual compounds and principals on which they work.

Key words: medicinal plants, NADP-dependent enzymes, phenolic compounds, flavonoids

Obsah

Seznam zkratk	3
1. Úvod.....	4
1.1. Počátky využívání protirakovinných léčiv z rostlin	4
1.2. Rostliny s protirakovinnými účinky	6
1.2.1. Léčiva získaná z exotických rostlin	7
1.2.2. Exotické rostliny a jejich účinky	8
1.3. Léčivé rostliny použité v této práci	10
1.4. NADP-dependentní enzymy	14
1.4.1. Glukosa-6-fosfátdehydrogenasa	15
1.4.2. Šikimátdehydrogenasa	16
1.4.3. NADP-Isocitrátdehydrogenasa	17
1.4.4. NADP-malátdehydrogenasa (oxalacetát dekarboxylační).....	18
2. Cíl práce	21
3. Materiál a metody	22
3.1. Chemikálie	22
3.2. Přístroje	23
3.3. Rostlinný materiál	23
3.4. Metody	24
3.4.1. Metody extrakce rostlinného materiálu	24

3.4.1.1. Extrakce metodou PVPP I pro stanovení enzymové aktivity	24
3.4.1.2. Extrakce metodou PVPP II pro stanovení enzymové aktivity.....	24
3.4.1.3. Extrakce methanolem	24
3.4.1.4. Extrakce horkou vodou	24
3.4.2. Stanovení enzymové aktivity	25
3.4.2.1. Složení reakční směsi pro stanovení aktivity G6PDH.....	25
3.4.2.2. Složení reakční směsi pro stanovení aktivity SDH.....	26
3.4.2.3. Složení reakční směsi pro stanovení aktivity NADP-ICDH.....	26
3.4.2.4. Složení reakční směsi pro stanovení aktivity NADP-ME	26
3.4.3. Stanovení celkového množství fenolických látek.....	26
3.4.4. Kalibrační křivka pro stanovení celkového množství fenolických látek	26
3.4.5. Stanovení celkového množství flavonoidů	27
3.4.6. Kalibrační křivka pro stanovení celkového množství flavonoidů	27
4. Výsledky	28
4.1. Aktivita studovaných enzymů v různých léčivých rostlinách.....	28
4.2. Stanovení celkového množství fenolických látek	33
4.3. Stanovení celkového množství flavonoidů	34
5. Diskuse.....	36
6. Závěr	39
7. Seznam použité literatury	40

Seznam zkratek

DHD	3-dehydrochinátdehydratasa (EC 4.2.1.10)
DHD/SDH	bifunkční enzym 3-dehydrochinátdehydratasa/šikimátdehydrogenasa
DNA	deoxyribonukleová kyselina
FAD	flavinandenindinukleotid
FCR	Folin-Coicalteu reagent – Folin-Coicalteuovo činidlo
g	tíhové zrychlení ($g = 9,80665 \text{ m.s}^{-2}$)
G6PDH	D-glukosa-6-fosfátdehydrogenasa (EC 1.1.1.49)
GOGAT	glutamátsynthasa (NAD(P)H-GOGAT, EC 1.4.1.13-14)) (Fd-GOGAT, EC 1. 4. 7. 1)
GS	glutaminsynthetasa (EC 6.3.1.2)
MDR	multi-drug resistance – mnohočetná léková rezistence
MetOH	methanol
NAD(H)	nikotinamidadenindinukleotid (redukovaný)
NAD-ICDH	NAD-dependentní isocitrátdehydrogenasa (EC 1. 1. 1. 41.)
NADP(H)	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (redukovaný)
NADP-ICDH	NADP-dependentní isocitrátdehydrogenasa (EC 1.1.1.42)
NADP-ME	NADP-dependentní malátdehydrogenasa (oxalacetát dekarboxylační) (EC 1.1.1.40)
NMR	nuclear magnetic resonance – nukleární magnetická rezonance
NSCLC	non-small cell lung cancer – nemalobuněčný nádor plic
PVPP	polyvinylpolypyrrolidon
ROS	reactive oxygen species – reaktivní formy kyslíku
SDH	šikimátdehydrogenasa (EC 1.1.1.25)

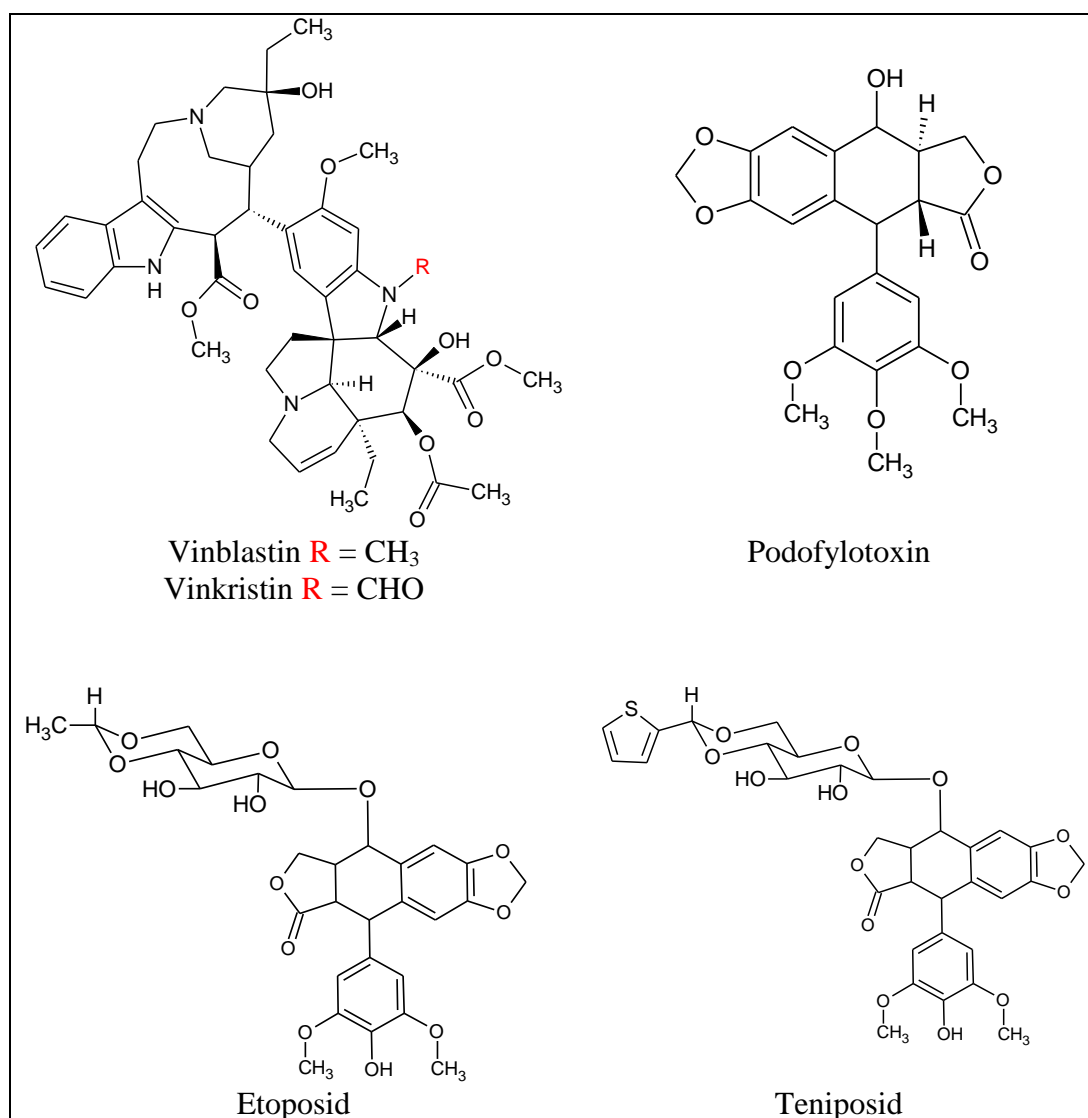
1. Úvod

1.1. Počátky využívání protirakovinných léčiv z rostlin

Rostliny hrají důležitou roli při hledání efektivního protirakovinného léčiva. Více jak 60% dnes používaných protirakovinných léčiv jsou deriváty látek z přírodních zdrojů, jako jsou rostliny, mořské organismy nebo mikroorganismy. Pátrání po protirakovinných látkách s rostlinným původem začalo v 50. letech 20. století objevením vinka alkaloidů ve *Vinca minor*, vinblastinu a vinkristinu (obr. 1, str. 5), a izolací cytotoxického podofylotoxinu [1]. Mezi další chemoterapeutika odvozená z rostlin patří hlavně taxany a kamptoteciny. Všechny tyto látky jsou dnes běžně používány při léčbě různých druhů rakoviny [2, 3]. Přípravě těchto léků bylo věnováno 20-30 let výzkumu, trpělivosti a značných finančních prostředků [1].

Vinka alkaloidy izolované z katarantu růžového, *Catharantus roseus*, byly první protirakovinné látky, které byly klinicky využity. Katarantus růžový byl původně používán různými kulturami pro léčbu cukrovky. Vinka alkaloidy jsou pro léčbu rakoviny používány více jak 40 let [2, 3]. Z vinblastinu a vinkristinu byla připravena polosyntetická analoga vinorelbin a vindesin. Tyto látky jsou užívány v kombinaci s dalšími chemoterapeutickými léčivy pro léčbu různých druhů rakoviny, včetně leukémie, nádorů lymfatické tkáně, rakoviny prsu, rakoviny plic, pokročilé rakoviny varlat [1]. Vinka alkaloidy a jejich polosyntetické deriváty blokují mitosu v metafázi, což vede k apoptose [4].

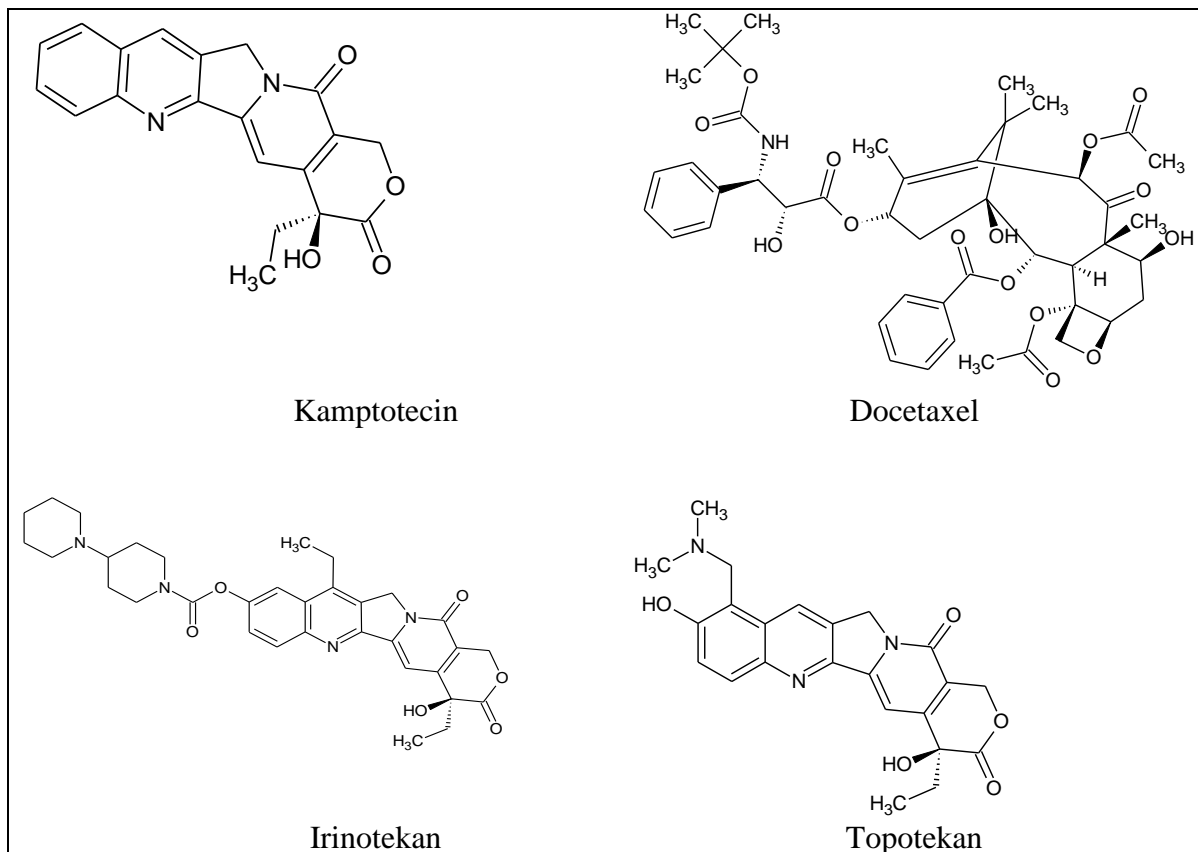
Podofylotoxin (obr. 1, str. 5) pochází z rostlin z rodu *Podophyllum*, jako je *Podophyllum peltatum* nebo *Podophyllum emodii*, a již v dávných dobách se tyto rostliny používaly pro léčbu bradavic a rakoviny kůže. Bylo izolováno mnoho látek podobných podofylotoxinu, několik z nich bylo dokonce klinicky testováno. Od těchto testů bylo ovšem brzy upuštěno pro nedostatečnou účinnost a nepříjemnou toxicitu. Rozsáhlý výzkum vedl k syntéze derivátů etoposidu a teniposidu (obr. 1, str. 5), které jsou dnes využívány k léčbě rakoviny průdušek a varlat [1]. Deriváty podofylotoxinu, teniposid a etoposid, jsou ireverzibilními inhibitory topoisomerasy II. Vytvoří komplex DNA-účinná látka-enzym, který způsobuje zlomy v jedno i dvouvláknové DNA, což vede k buněčné smrti [5].



Obr. 1: Vzorce vinblastinu, vinkristinu, podofylotoxinu, etoposidu a teniposidu.

Taxany byly izolovány z kůry tisů západoamerického, *Taxus brevifolia*. Různé části tisů západoamerického a dalších druhů tisů byly používány americkými domorodými kmeny k léčení nerakovinných onemocnění. V tradiční indické medicíně byly použity listy z tisů červeného, *Taxus baccata*, k léčbě rakoviny. Paklitaxel nacházející se v listech různých druhů tisů je používán pro léčbu rakoviny prsu, vaječníku, nemalobuněčných nádorů plic (non-small cell lung cancer, NSCLC) a je účinný i proti Kaposiho sarkomu. Docetaxel (obr. 2, str. 6), analog paklitaxelu, je užíván hlavně pro léčbu rakoviny plic a NSCLC [1]. Taxany, včetně paklitaxelu a jeho derivátů, se váží na tubulin, stabilizují ho a zabraňují tak jeho depolymerizaci a následnému dělení buňky [6].

Deriváty kamptotecinu jsou další důležité látky s protirakovinným účinkem (obr. 2). Kamptotecin byl původně izolován z čínského okrasného stromu *Camptotheca acuminata*. Od klinického testování kamptotecinu bylo brzy upuštěno, protože má velmi toxické účinky na močový měchýř. Rozsáhlý výzkum vedl k syntéze účinnějších derivátů, topotekanu a irinotekanu (obr. 2). Topotekan slouží k léčbě rakoviny vaječníků a malobuněčných nádorů plic. Irinotekan je používán k léčbě kolorektálního karcinomu. Kamptotecin selektivně inhibuje topoisomerasu I, která štěpí a znovu spojuje DNA [1].



Obr. 2: Vzorce kamptotecinu, docetaxelu, irinotekanu a topotekanu

1.2. Rostliny s protirakovinnými účinky

Z rostlin bylo izolováno mnoho typů bioaktivních látek, jako jsou alkaloidy, kumariny, kukurbitaciny, diarylheptanoidy, mastné kyseliny, flavonoidy, iridoidy, lignany, limonoidy, naftochinony, deriváty fenantrenů, polyacetyleny, stilbenoidy, seskviterpenoidy

nebo triterpenoidy [2]. Tyto látky patří mezi sekundární metabolity rostlin. Hlavní funkce sekundárních metabolitů je signalizace a ochrana rostliny. Některé sekundární metabolity mají pro člověka velmi důležitou antioxidační aktivitu, obsahují totiž molekuly schopné odstraňovat volné radikály, jejichž nadprodukce může být rizikovým faktorem vzniku různých onemocnění, jako například aterosklerózy, rakoviny nebo cukrovky. Volné radikály způsobují oxidativní poškození makromolekul, hlavně lipidů, proteinů a DNA. Cai ve své studii, kde se zabýval tradičními čínskými bylinami, dokázal, že celkový obsah fenolických látek úzce souvisí s antioxidační aktivitou rostliny [7].

1.2.1. Léčiva získaná z exotických rostlin

Rostlinných látek a rostlin, u kterých byly studovány antikancerogenní účinky je mnoho po celém světě. To dokumentují následující příklady.

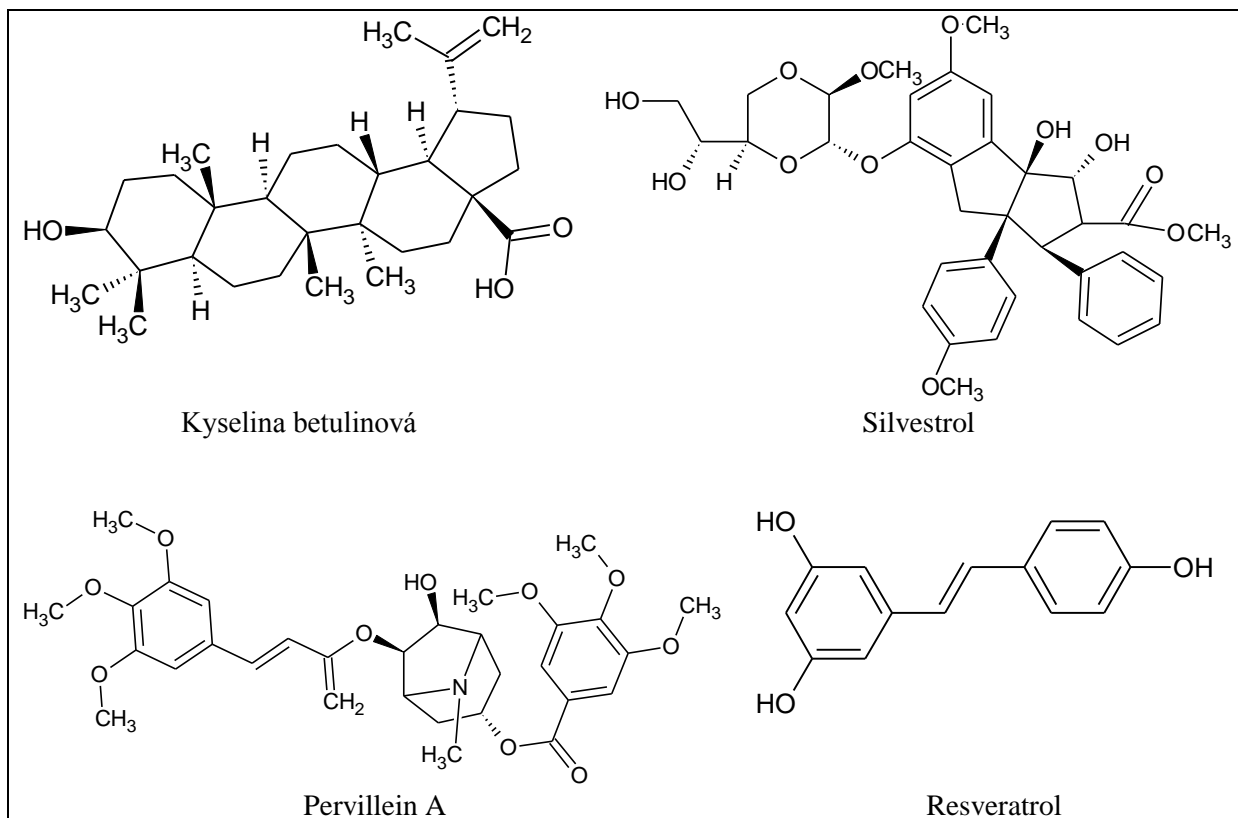
Kyselina betulinová patří mezi pentacyklické triterpeny, byla izolována z jujuby čínské, *Ziziphus mauritiana*, která se běžně nachází v Zimbabwe (obr. 3, str. 8). Kyselina betulinová vykazuje selektivní toxicitu vůči mnoha buněčným liniím nádoru kůže. Biologické studie ukazují, že kyselina betulinová účinkuje na základě indukce apoptosy [2]. Tato kyselina vykazuje i další důležité biologické aktivity, včetně antibakteriálního působení, protizánětlivých účinků, dokonce funguje jako antimalarikum. [1].

Na severu Madagaskaru roste rudořev, *Erythroxylum pervillei*, rostlina z jejichž kořenů byl izolován Pervillein A [2] (obr. 3, str. 8). Tato látka inhibuje mnohočetnou lékovou rezistenci (MDR), která způsobuje nedostatečnou odpověď organismu na chemoterapii. MDR je způsobována proteinem (P-glykoprotein), který velmi efektivně eliminuje léčivou látku z buňky a zabraňuje tak jejímu působení proti nádorům. Pervillein A inhibuje tento protein a obnovuje tak sensitivitu buňky k léčivé látce [8].

Silvestrol je látka původně izolovaná z plodů *Aglaia folveolata*, která se vyskytuje v Indonésii (obr. 3, str. 8). Jeho chloroformový extrakt má cytotoxické účinky proti rakovinným buňkám plic, prsu a prostaty [2].

Resveratrol (obr. 3, str. 8) byl izolován z rostliny běžně rostoucí v Peru, *Cassia quiquangulata* [2]. Resveratrol vykazuje protirakovinné účinky, jako je potlačení

proliferace rakovinných buněk, potlačení aktivace transkripčních faktorů nebo inhibice proteinkinas. Resveratrol byl nalezen v mnoha běžných rostlinách, jako jsou hrozny, bobulovité plody, arašidy nebo eukalyptus [9].



Obr. 3: Vzorce kyseliny betulinové, silvestrolu, pervilleinu A a resveratrolu.

1.2.2. Exotické rostliny a jejich účinky

To, že fenolické látky významně přispívají k antioxidační aktivitě léčivých bylin, bylo dokázáno v mnoha dalších studiích [10, 11, 12, 13, 14].

Cai *et al.* (2004) studovali 112 tradičních čínských léčivých rostlin, stanovil celkové množství fenolických látek, flavonoidů a taninů. Flavonoidy, které dále dělíme na flavony, flavonoly, flavanoly, chalkony, biflavonoidy (dimery flavonů, flavonolů a flavanonů) a další. Sloučeniny dusíku, vitaminy a terpenoidy také patří k sekundárním metabolitům s vysokými antioxidačními aktivitami. Nejběžnější flavony byly nalezeny

v rostlinách z čeledí Labiatae a Compositae, v kořenech *Scutellaria baicalensis*, v květenství *Chrysanthemum morifolium* nebo v nadzemních částech *Artemisia annua*. Flavonoly, mezi které patří kvercetin a myricetin, byly především nalezeny v léčivých rostlinách, u kterých se předpokládají protirakovinné účinky. Jsou to například květy z rostlin *Sphora japonica* a *Rosa chinensis*, oddenek z *Alpinia officinarum* nebo plody z *Crataegus pinnatifida*. Katechin je příklad flavanolu, který byl nalezen v *Camellia sinensis* a *Acacia catechou*. Kumariny a lignany byly nalezeny v mnoha rostlinných čeledích, například Compositae, Magnoliaceae, Oleaceae nebo Leguminosae [7].

Podobná studie byla provedena i v Thajsku. Nisirat Siriwatanametanon *et al.* (2010) stanovili protizánětlivé aktivity, cytotoxické aktivity a antioxidační aktivity thajských léčivých rostlin. Extrakt z *Pouzolzia indica* silně inhiboval buněčnou aktivitu mitochondrií jak klasických nádorových buněk, tak nádorových buněk s mnohočetnou lékovou rezistencí. Extrakty z *Rhinacanthus nasutus* a z *Gynura pseudochina* inhibovaly spíše nádorové buňky s mnohočetnou lékovou rezistencí. Extrakt z *R. nasutus* dále vykazoval nejvyšší cytotoxicitu vůči HeLa buňkám. Extrakty dále vykazovaly protivirové a protizánětlivé účinky. Nejvyšší antioxidační účinky měl extrakt *Cayratia trifolia*, která současně obsahovala nejvyšší množství fenolických látek. Fenolické látky byly stanoveny metodou Folin-Coicalteau [10].

11 různých rostlin používaných v Bangladéši v lidové medicíně bylo podrobeno testům na embryích mořského ježka, na tumorových buněčných liniích, na červených krvinkách a na larvách mořského raka. Extrakt z *Oroxylum indicum* vykazoval nejvyšší aktivitu vůči tumorovým buňkám i embryím mořského ježka. Extrakty z *Aegle marmelos* vykazovaly aktivitu při všech testech, což bylo známkou přítomnosti cytotoxické látky. Tato data nasvědčují tomu, že extrakty z *Aegle marmelos* budou toxické jak pro rakovinné, tak pro zdravé buňky. Celkem 8 z původních 11 studovaných rostlin vykazovalo při použitých testech určitou aktivitu, ovšem pouze 3 z nich, *Oroxylum indicum*, *Aegle marmelos* a *Moringa oleifera*, mohly být považovány za potenciální zdroj protirakovinných léčiv, protože vykazovaly dostatečnou aktivitu při nízkých koncentracích [11].

Bohatou tradicí v Kamerunu je používání léčivých rostlin pro léčbu infekčních nemocí, rakoviny, zánětů a fyzických zranění. Mbaveng *et al.* (2011) studovali

4 kamerunské rostliny, aby určili jejich protirakovinné účinky a inhibiční aktivitu vůči reverzní transkriptase. *Bersama engleriana* je v tradiční kamerunské medicíně používána k léčbě rakoviny, křečí, infekčních nemocí, mužské neplodnosti a cukrovky. *Cupressus lisitanica* je tradičně užívána při léčbě revmatu, kožních infekcí a rakoviny. Pro léčbu hypertenze a infekčních nemocí se v Kamerunu používá *Guibourtia tessmannii*. *Vitellaria paradoxa* léčí lepru, onemocnění kůže, průjem a další. Extrakty z těchto rostlin byly testovány na 5 různých liniích rakovinných buněk. Extrakty ze všech rostlin, kromě *V. paradoxa*, inhibovaly proliferaci ve všech 5-ti liniích rakovinných buněk. Extrakt z *B. engleriana* byl dostatečně aktivní u 2 z 5 studovaných rakovinných linií, přičemž nejúčinnější byl extrakt z kůry. Aktivní vůči rakovinným buňkám byly také extrakty získané z listů a kůry *G. tessmannii* a dále extrakt z kůry *C. lusitanica* [12].

V Rusku zkoumali protirakovinné účinky na 45 rostlinách. Extrakty devíti z nich vykazovaly extrémní cytotoxické účinky. Mezi tyto rostliny patří *Sanguisorba officinalis*, *Quercus robur* nebo *Bidens tripartita* [13].

Bouayed *et al.* (2007) studovali 5 typických íránských bylin. Stanovovali celkové množství fenolických látek, flavonoidů a antioxidační aktivitu. Nejvyšší koncentrace jak fenolických látek, tak flavonoidů byla nalezena v extraktech z listů *Melissa officinalis*. Extrakty z *Levandula officinalis* a *M. officinalis* vykazovaly nejvyšší antioxidační aktivitu ze všech 5 studovaných rostlin. Extrakt z *Alcea kurдика* naopak vykazoval nejnižší antioxidační aktivitu i nejmenší koncentraci flavonoidů a fenolických látek [14].

1.3. Léčivé rostliny použité v této práci

Cibule a česnek patří mezi první cíleně pěstované plodiny hlavně díky možnosti jejich dlouhodobému skladování. Česnek má antivirové účinky, upravuje kardiovaskulární a imunitní systém. Dále má antioxidační a protirakovinné účinky [15]. Organické sloučeniny obsahující síru, hlavně deriváty allylu, zabraňují tvorbě DNA aduktů, inhibují mutagenezi, modulují enzymovou aktivitu, vykazují schopnost ničit volné radikály, zpomalují růst tumorů a navíc zabraňují proliferaci buněk tím, že indukují apoptosu. Všechny tyto účinky jsou důležité pro ochranu organismu [16]. V Indii byl česnek používán k zastavení šíření infekce v ráně a k uchovávání potravin déle čerstvých.

V Irsku byl česnek používán k boji s plicními infekcemi. V první světové válce byl česnek užíván ke zmírnění střevních infekcí vojáků bojujících na Balkáně [15]. I další rostliny z čeledi *Allium* mají antibakteriální a fungicidní účinky. Benkeblia *et al.* (2003) studovali antimikrobiální (antibakteriální a fungicidní) aktivitu esenciálních olejů česneku a třech různých druhů cibule. Esenciální oleje, extrahované parní destilací vykazovaly zřejmou inhibiční aktivitu vůči bakteriím. Extrakt z česneku měl v porovnání s extrakty z cibulí silnější inhibiční účinek. *Salmonella enteritidis* byla k extraktům mnohem citlivější než *Staphylococcus aureus*. Antibakteriální aktivita proti *S. aureus* byla ještě zvýšena zahřátím extraktu po dobu 45 minut na 121°C. Stejně jako u bakterií měl extrakt z česneku silnější inhibiční účinek i proti plísním. Ze studie také vyplývá, že antibakteriální i fungicidní aktivita hodně závisí na druhu cibule a česneku, ze kterých jsou extrakty připraveny [17]. Antibakteriální účinky česneku jsou připisovány allicinu. Extrakt z česneku i samotný allicin vykazují bakteriostatický účinek proti enterokokům resistantním vůči vankomycinu [15].

Aloe patří do čeledi Liliovitých. Celkem je známo 360 druhů aloe. *Aloe vera*, nejběžnější z druhů aloe, je široce využívána v tradičních kulturách pro její léčivé a kosmetické účinky a dále pro přípravu pokrmů a nápojů. Mezi léčivé účinky aloe patří protirakovinné a protizánětlivé účinky a antioxidační aktivita [18]. Z čerstvých listů *Aloe vera* dostáváme žlutě zabarvenou hořkou tekutinu, která je používána pro pročištění organismu, a slizovitý gel z parenchymu, který se používá pro léčbu kožních poranění a popálenin. Protizánětlivé účinky vodných a chloroformových extraktů z *Aloe vera* se velmi blíží účinnosti protizánětlivých léků indometacinu a dexametasonu [19].

Meduňka lékařská, *Melissa officinalis*, původně pochází ze Středozeří a západní Asie. Vodný a alkoholový extrakt meduňky se tradičně používá pro zmírnění křečí hladkého svalstva a zklidnění nervového systému. Extrakt z meduňky má příznivý vliv na psychickou vyrovnanost a zlepšuje kognitivní schopnosti zdravých jedinců. Ethanolový extrakt z meduňky se používá k alternativní léčbě Alzheimerovy nemoci, vzhledem k tomu, že na trhu dostupné léky proti této nemoci nemají uspokojivé účinky. Ve studii zhodnocující účinky ethanolového extraktu z meduňky a dalších léčivých rostlin na pacienty trpící Alzheimerovou nemocí bylo zjištěno, že po 16 týdnech perorálního

užívání extraktu došlo k významnému zlepšení kognitivních schopností pacientů. Studie byla placebem kontrolovaná, dvojitě zaslepená a s náhodně vybranými pacienty [20]. Meduňka má také antivirové a antioxidační účinky. Esenciální oleje z meduňky vykazují antibakteriální a fungicidní účinky a působí proti parazitům. Sousa *et al.* (2004) zjišťovali schopnost esenciálních olejů z meduňky působit proti nádorům na 6-ti rakovinných buněčných liniích včetně jedné myši melanomové linie. Z této studie vyplývá, že esenciální oleje z meduňky mají inhibiční vliv na životaschopnost mnoha rakovinných buněčných linií. Při zředění esenciálních olejů 1:50 000 až 1:20 000 byl jejich inhibiční vliv pozorován na všech rakovinných buňkách. Protinádorová aktivita byla v mnoha případech připisována specifické složce oleje geraniolu, který inhibuje proliferaci lidských rakovinných buněk *in vitro*. Také inhibuje pankreatické nádory a nádory kůže *in vitro* i *in vivo* [21].

Máta peprná (*Mentha piperita*), neboli pepermint, je známý lék používaný při problémech zažívacího traktu. Máťová silice, obsažená v pepermintu, se používá k léčbě žaludečních nevolností, nadýmání, zvracení a také ke zmírnění žaludečních křečí a zažívacích potíží [22]. Máta citronová (*Mentha citrata*) má také příznivý vliv na zažívací trakt a pomáhá zmírňovat žaludeční nevolnosti stejně jako máta peprná [23]. Máta má dále stimulační, antiseptické, antibakteriální, fungicidní a protizánětlivé účinky a produkuje řadu metabolitů, jako jsou terpeny, taniny, flavonoidy nebo fenolické látky. Bylo zjištěno, že za antimikrobiální účinky máty odpovídá menthol, linalool a mnoho dalších sekundárních metabolitů [22].

Bazalka pravá (*Ocimum basilicum*) se tradičně používá v gastronomii k dochucování pokrmů, k výrobě parfémů, ale i v lékařství. Podle tradiční medicíny mají listy a květy z bazalky pozitivní účinky proti nadýmání, křečím, bolestem břicha a navíc podporují tvorbu mateřského mléka. V Pákistánu bylo studováno chemické složení, antioxidační a antimikrobiální aktivity esenciálních olejů z bazalky v závislosti na ročním období. Esenciální oleje vykazovaly větší antibakteriální než fungicidní aktivitu. Obsah esenciálních olejů v bazalce nebyl v průběhu celého roku stejný. Největší množství esenciálních olejů měla bazalka v zimě a nejméně v létě. Esenciální oleje, získané

z bazalky nasbírané v zimě a na jaře, měly lepší schopnost odstraňovat volné radikály než ty získané v létě a na podzim [24].

V tradiční medicíně je využívána i ředkev černá, *Raphanus sativus niger*. Je používána jako přírodní lék proti nadýmání a nedostatečnému trávení potravy. Dále zabraňuje tvorbě žlučnickových kamenů, podporuje tvorbu a funkci žluči. Tento lék obsahuje esenciální oleje, flavonoidy a další polyfenolické látky. Tekutina, vylisovaná z ředkve černé, vykazuje silné antioxidační vlastnosti v odstraňování volných radikálů v různých *in vitro* experimentálních systémech. Extrakt z ředkve je prokázáný antioxidant a je také dobrým chelatačním činidlem [25].

Šalvěj lékařská, *Salvia officinalis*, byla po staletí používána v tradiční medicíně. Má uklidňující účinky a pomáhá proti nadýmání [26]. Dále má šalvěj protizánětlivé účinky. Ty byly studovány v extraktech šalvěje získaných 3 různými způsoby: extrakcí v metanolu, chloroformu a *n*-hexanu. Chloroformový extrakt měl nejvyšší protizánětlivé účinky, proto byl frakcionován a byla identifikována aktivní složka. Tou je kyselina urosolová, jejíž protizánětlivý účinek byl porovnán s kyselinou oleanolovou a indometacinem, nesteroidním lékem. Kyselina urosolová z těchto látek nejvíce redukovala zánět [27].

Stejně jako meduňka i šalvěj má příznivý vliv na pacienty trpící Alzheimerovou nemocí, i když může mít vedlejší účinky v podobě zvracení, závratí a nervozity vzhledem k tomu, že stimuluje acetylcholinové receptory [26]. Antioxidační aktivitu polyfenolických látek z šalvěje studoval Lu a Foo (2001). Antioxidační aktivita v této studii byla vztažena na aktivitu troloxu, což je syntetický ekvivalent vitamínu E. Bylo zjištěno, že v šalvěji obsažená kyselina rosmarinová, kyselina salvianolová K a I, kumarin a kyselina sagerinová výborně odstraňují volné radikály. Tyto kyseliny mají také inhibiční účinek na xanthinoxidasu, která vytváří superoxidový anion přeměnou hypoxantinu na xantin. Kyselina rosmarinová má až 20-krát silnější účinky v odstraňování superoxidového aniontu než trolox. Flavonoidy obsažené v šalvěji, mezi které patří luteolin a apigenin, mají však účinnost při odstraňování volných radikálů mnohem slabší [28].

Kopřiva dvoudomá, *Urtica dioica*, se již staletí používá proti revmatickým onemocněním. U pacientů s revmatoidní artritidou byla zjištěna výšená aktivita NF- κ B

transkripčních faktorů. Tyto faktory jsou důležité pro vyvolání exprese mnoha genů, které se podílejí na odpovědi organismu na zánět. Mezi tyto geny patří i geny kódující prozánětlivé enzymy. Při zánětlivých onemocněních je aktivita těchto faktorů zvýšena a je tedy zvýšena i exprese genů. Fosforylace a následná degradace IκB podjednotky v proteasomu aktivuje NF-κB transkripční faktory. Reihemann *et al.* (1999) ve své studii dokázali, že extrakt z listů kopřivy má na transkripční faktory NF-κB inhibiční účinek, spočívající v zabránění degradaci inhibiční IκB podjednotky [29].

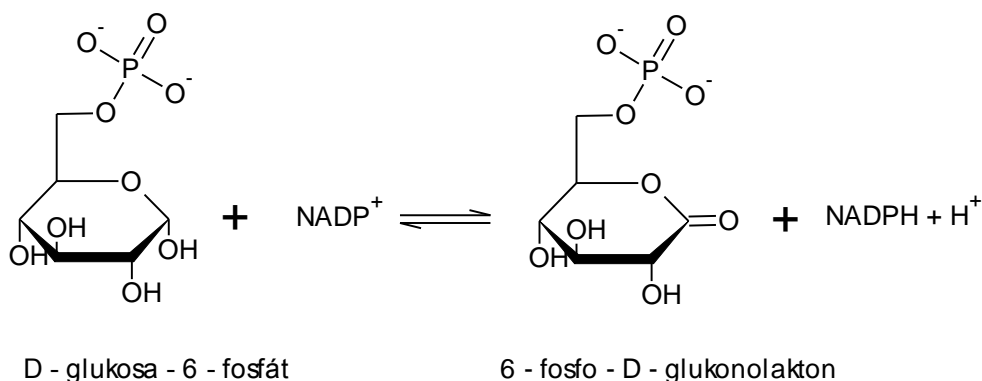
Zázvor lékařský (*Zingiber officinale*) je již po staletí důležitou součástí jak ájurvédské medicíny, tak Tibb-Unani, neboli arabské bylinné medicíny. Usnadňuje léčbu zánětů, zánětů dásní, bolesti zubů, revmatitidy, nervových onemocnění, mrtvice, astmatu, zácpy nebo cukrovky. Zázvor také snižuje srážlivost krve, inhibuje hromadění krevních destiček a produkci thromboxanu-B₂. Dále bylo zjištěno, že zázvor ulevuje od bolesti a snižuje hladinu cholesterolu. Schopnost zázvorového extraktu snižovat cholesterol je klinicky důležitá, protože jeho užívání nezpůsobuje žádné vedlejší účinky ani komplikace [30]. Zázvor je velmi užitečný při prevenci proti pooperačním nevolnostem a zvracení. Aktivní složky zázvoru, gingeroly, velmi efektivně působí rovněž proti bakterii *Helicobacter pylori* způsobující žaludeční vředy. Zázvorový extrakt vykazuje antibakteriální účinky také vůči *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* a *Candida albicans*. Mnoho extraktů a frakcí *Z. officinale* chrání tkáň proti chemickému poškození. [6]-gingerol vykazuje mimo antiapoptotických účinků také antioxidační účinky *in vivo* i *in vitro* [31].

1.4. NADP-dependentní enzymy

Vzhledem k tomu, že účinné látky v léčivých rostlinách vznikají především biosyntézou sekundárních metabolitů a pro mnohé biosyntetické pochody je nezbytné NADPH, byla v této práci sledována aktivita základních NADP-dependentních enzymů, poskytujících NADPH: glukosa-6-fosfátdehydrogenasy (G6PDH, EC 1.1.1.49), NADP-isocitrátdehydrogenasy (NADP-ICDH, EC 1.1.1.42), NADP-malátdehydrogenasy (oxalacetát dekarboxylační) (NADP-ME, z anglického NADP-malic enzyme, EC 1.1.1.40) a enzymu spotřebovávajícího NADPH šikimátdehydrogenasy (SDH, EC 1.1.1.25), hlavního enzymu šikimátové dráhy vedoucí k biosyntéze sekundárních metabolitů.

1.4.1. Glukosa-6-fosfátdehydrogenasa

Glukosa-6-fosfátdehydrogenasa je jeden z klíčových enzymů oxidativního pentosafosfátového cyklu. Katalyzuje oxidaci glukosa-6-fosfátu na 6-fosfoglukonolakton za současné redukce NADP^+ na NADPH.

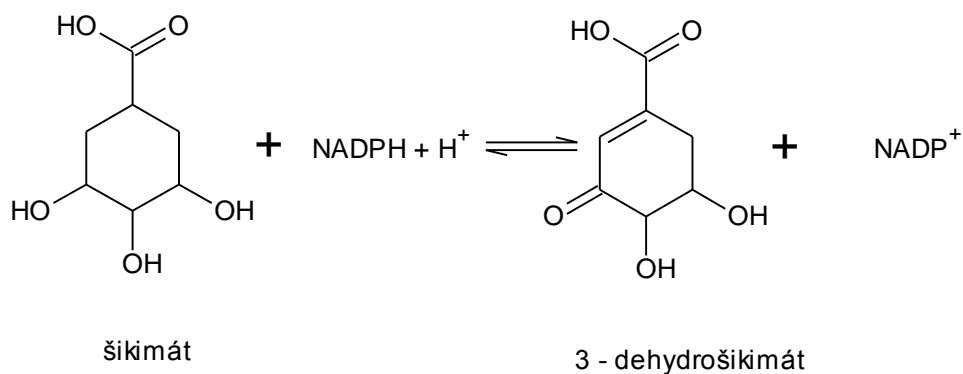


Oxidativní pentosafosfátový cyklus poskytuje NADPH pro další dráhy. Tento cyklus dále poskytuje metabolity sloužící jako prekurzory pro syntézu aromatických aminokyselin, polymerů tvořících buněčné stěny nebo pigmentů. Ve vyšších rostlinách je enzym G6PDH přítomen ve 2 kompartmentech, cytosolu a plastidech. Chloroplastová G6PDH je za světla inaktivována feredoxin-thioredoxinovým systémem, aby se předešlo zbytečné výměně uhlíku mezi oxidativním pentosafosfátovým a Calvinovým cyklem. G6PDH byla také nalezena v peroxizomech, kde působí proti vzniku H_2O_2 [32]. Cytosolová G6PDH je inhibována NADPH. Hlavní funkcí cytosolového enzymu G6PDH je produkce NADPH pro biosyntetické a asimilační procesy [33].

Důležitou funkcí G6PDH je odpověď metabolismu na stres vnějšího prostředí, jako je solný stres, teplotní stres nebo stres způsobený toxicitou kovů [34]. U rostlin vystavených solnému stresu dochází ke zvýšení aktivity NADPH-produkujících enzymů (včetně G6PDH), pravděpodobně proto, aby regenerovaly NADPH nezbytné pro ochranu rostliny proti oxidativnímu poškození [35]. Poškození způsobené toxicitou těžkých kovů způsobuje pokles tvorby ATP, G6PDH je v takovýchto stresových podmínkách stimulována ke zvýšení aktivity a tedy ke kompenzaci nedostatku energie [34].

1.4.2. Šikimátdehydrogenasa

Šikimátdehydrogenasa je enzym katalyzující 4. krok v šikimátové dráze, a to přeměnu šikimátu na 3-dehydrošikimát za přítomnosti koenzymu NADPH. Tato reakce je reversibilní.



Šikimátovou dráhou je syntetizován chorismát, který je prekurzorem pro biosyntézu aromatických aminokyselin fenylalaninu, tyrosinu a tryptofanu a dále ligninů a flavonoidů. Aromatické aminokyseliny jsou využity k proteosyntéze, ale hlavně to jsou prekurzory pro velké množství sekundárních metabolitů, které chrání rostlinu mimo jiné před hmyzem, býložravci a UV zářením. 20% z celkového množství uhlíku fixovaného rostlinou prochází šikimátovou dráhou.

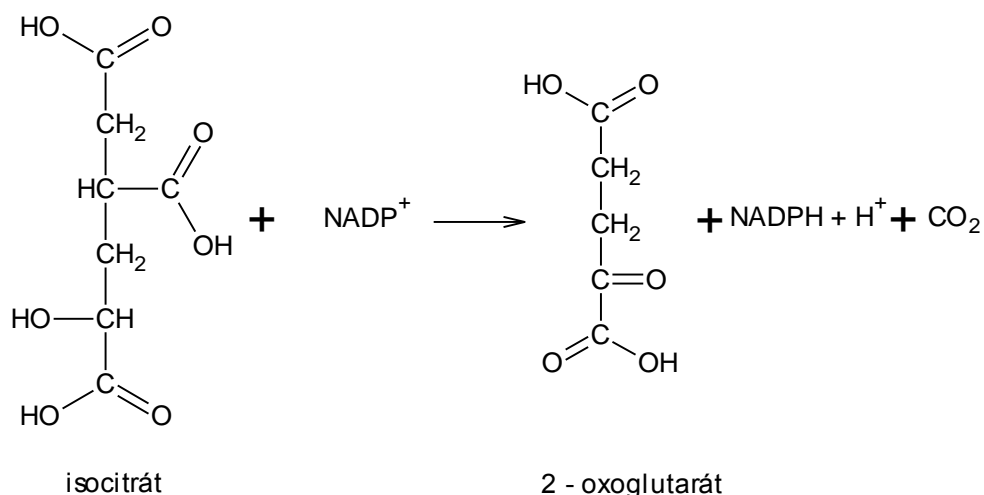
Ve vyšších rostlinách má SDH také funkci dehydrochinátdehydratasu, 3. a 4. krok šikimátové dráhy je katalyzován jedním bifunkčním enzymem 3-dehydrochinátdehydratasou/šikimátdehydrogenasou (DHD/SDH, EC 4. 2. 1. 10). Stupeň přeměny 3-dehydrochinátdehydratasou (DHD, EC 4.2.1.10) je zhruba 1/9 stupně přeměny šikimátdehydrogenasou, dehydrochinát je tedy prakticky okamžitě přeměněn na šikimát, bez toho aniž by se hromadil 3-dehydrošikimát [36]. Tento enzym je nezbytný pro vývoj rostliny. Při snížení aktivity DHD/SDH na 40% dochází k velkému zpomalení růstu. Další snížení aktivity tohoto enzymu mělo letální následky [37].

Sekundární metabolity chrání rostlinu při stresových podmínkách. Aktivita SDH v listech *Vallisneria natans* se zvyšuje, stejně jako obsah fenolických látek a flavonoidů, když je rostlina vystavena účinkům olova [38]. U mnoha rostlin vystavených biotickému i

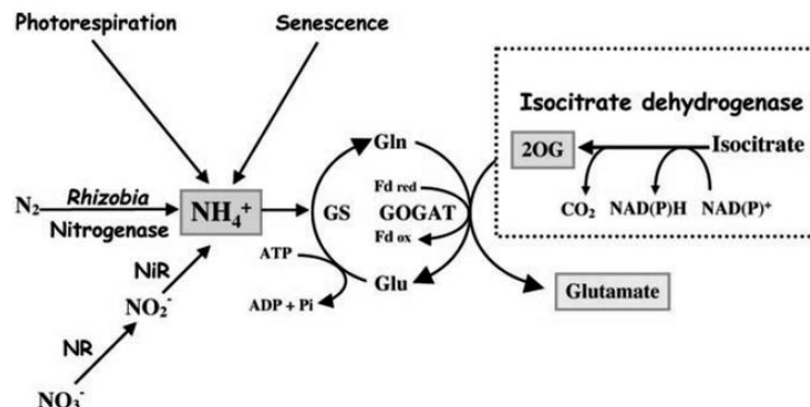
abiotickému stresu, jako je nedostatek minerálů, sucho, UV záření nebo mechanické poškození, byla zjištěna změna v celkovém obsahu ligninů [39].

1.4.3. NADP-Isocitrátdehydrogenasa

NADP-dependentní isocitrátdehydrogenasa katalyzuje oxidativní dekarboxylaci isocitrátu na 2-oxoglutarát, za současného vzniku NADPH a CO₂. 2-oxoglutarát je metabolit velmi důležitý pro asimilaci dusíku [40].



Asimilace dusíku probíhá za účasti dvou enzymů glutaminsynthetasy (GS, EC 6.3.1.2) a glutamátsynthasy (NAD-GOGAT, EC 1.4.1.14) které dohromady tvoří GS/GOGAT cyklus. GS nejprve přeneseme amoniový ion na glutamát za vzniku glutaminu. Fixovaný dusík je pak přenesen na uhlíkovou kostru ve formě 2-oxoglutarátu za vzniku 2 molekul glutamátu (obr. 4, str. 18). Jedna molekula je pak využita pro tvorbu dalších molekul glutaminu, druhá molekula představuje aktuální výtěžek cyklu a slouží například jak prekurzor pro aminokyseliny prolin a arginin [41]. 2-oxoglutarát je poskytován enzymem citrátového cyklu NAD-ICDH (EC 1. 1. 1. 41.), ale i NADP-ICDH.



Obr. 4: Asimilace dusíku GS/GOGAT cyklem a produkce 2-oxoglutarátu isocitrátdehydrogenasou. Ačkoliv je zdrojů amoniových iontů v rostlině mnoho, je skoro výhradně asimilován GS/GOGAT cyklem. Ve vyšších rostlinách je proto potřeba dostatek ATP, redukovaný ferredoxin (případně NADH) a uhlíková kostra ve formě 2-oxoglutarátu, který je syntetizován NAD(P)-ICDH [41].

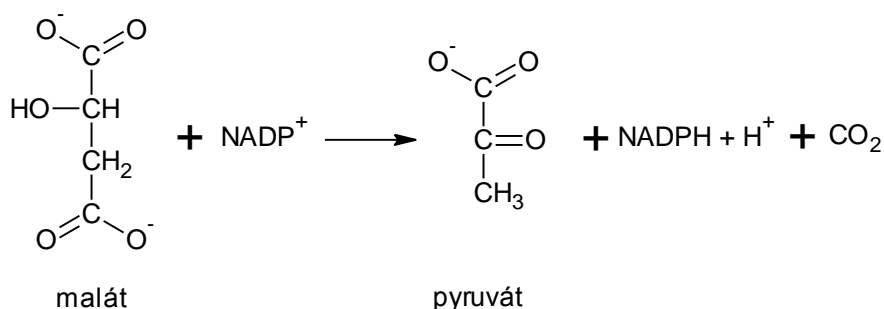
Je několik isoenzymů NADP-ICDH, které se dělí podle místa výskytu v buňce na cytosolovou, chloroplastovou, mitochondriální a peroxisomovou NADP-ICDH. Cytosolová NADP-ICDH je v listech nejvíce zastoupena a je odpovědná za 90% celkové aktivity NADP-ICDH v extraktech z listů [40]. Tato isoforma NADP-ICDH je převažující v mnoha rostlinách, mezi které patří rajčata, brambory a listy tabáku [41].

Tento enzym hraje důležitou úlohu v odpovědi rostliny na stresové podmínky. Při poškození pentosafosfátové dráhy, například snížení aktivity glukosa-6-fosfátdehydrogenasy v semenech hrachu setého při stresových podmínkách, bylo pozorováno zvýšení aktivity NADP-ICDH a tedy dostatečná tvorba NADPH, který je důležitý pro rostlinný růst a vývoj [42].

1.4.4. NADP-malátdehydrogenasa (oxalacetát dekarboxylační)

NADP-malátdehydrogenasa (oxalacetát dekarboxylační) katalyzuje v přítomnosti koenzymu NADP^+ oxidační dekarboxylaci malátu na pyruvát za současného vzniku

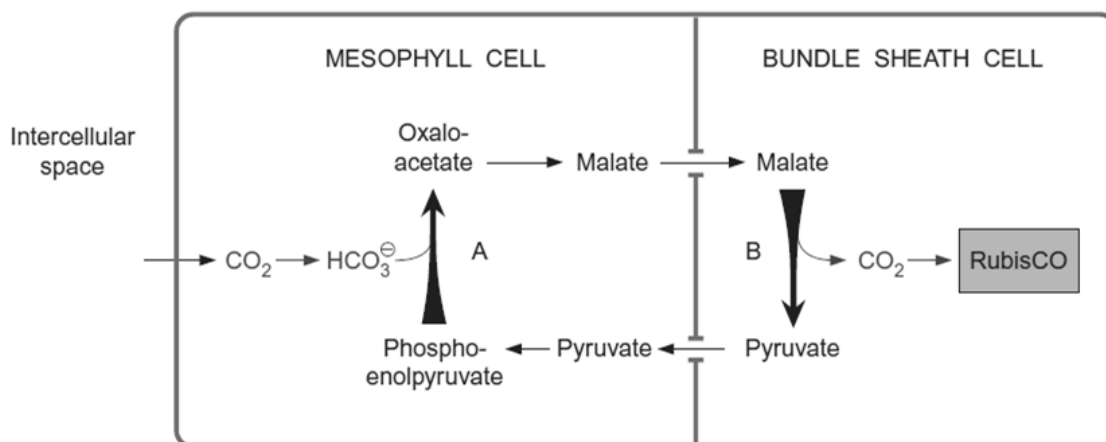
NADPH a CO_2 . Reakce probíhá v přítomnosti kofaktorů. Nejběžnějším kofaktorem je dvojmocný kation Mg^{2+} nebo Mn^{2+} [43, 44].



V rostlinách se vyskytují jak fotosyntetické tak nefotosyntetické isoformy NADP-dependentního enzymu v plastidech i cytoplasmě. V jedné buňce byly nalezeny různé isoformy lokalizované v jednom kompartmentu. V genomu *Arabidopsis thaliana* byly nalezeny geny pro celkem 4 isoformy, z toho tři kódují cytosolové isoformy a jedna isoformu plastidovou. Všechny isoformy jsou si velmi podobné, shodují se v 75-90 % primární struktury [45]. Funkce nefotosyntetických isoform NADP-ME nejsou úplně objasněny. Mezi předpokládané funkce nefotosyntetických isoform patří produkce pyruvátu a NADPH pro syntézu lipidů a aminokyselin v plastidech. Nefotosyntetické isoformy enzymu jsou odpovědné za kontrolu koncentrace malátu při nedostatku kyslíku, udržují intracelulární pH, jsou to zdroje energie pro anaboličké procesy v cytosolu a účastní se obranných mechanismů rostliny [43, 46]. Fotosyntetické isoformy jsou regulované prostřednictvím aktivátorů a inhibitorů, mezi které patří sukcinát, 2-oxoglutarát nebo oxalacetát. Dále jsou regulovány pomocí pH a inhibovány nadbytkem substrátu (malátu) [43].

NADP-ME je enzym, který se podílí na fixaci uhlíku v C_4 a CAM rostlinách tzv. C_4 fotosyntézou. Díky prostorovému či časovému oddělení prefixace a poskytování CO_2 pomocí NADP-ME přímo v místě jeho fixace Calvinovým cyklem, nedochází k velkým ztrátám vody jako u rostlin C_3 přijímajících CO_2 přímo přes povrch listů otevřenými průduchy. CO_2 je nejprve fixován ve formě oxalacetátu (čtyřuhlíkatá látka) v cytoplasmě mezofylových buněk. Poté je oxalacetát přenesen do chloroplastu mezofylových buněk, kde je redukován na malát, který je transportován do buněk pochev cévních svazků.

V buňkách pochev cévních svazků je enzymem NADP-ME přeměněn na pyruvát a CO_2 , který je pak fixován pomocí RubisCO (obr. 5) [47].



Obr. 5: **Mechanismus koncentrace CO_2 v rostlinách C₄-NADP-ME typu.** HCO_3^- je fixován v mezofylových buňkách reakcí s fosfoenolpyruvátem. Vzniklý oxalacetát je v chloroplastech redukován na malát. Ten opustí chloroplast mezofylové buňky a pomocí specifického translokátoru a difunduje do buněk pochev cévních svazků, kde oxidační dekarboxylací (NADP-ME) vzniká pyruvát, CO_2 a NADPH. Pyruvát je transportován zpět do chloroplastu mezofylových buněk, kde je fosforylován na fosfoenolpyruvát [47]

Zvýšená aktivita NADP-ME byla nalezena u rostlin vystavených solnému stresu, suchu nebo těžkým kovům. Při stresových podmínkách je NADP-ME vhodným zdrojem NADPH. Při stresu způsobeném kadmíem nadprodukce NADPH zajišťuje redoxní rovnováhu [48]. V rostlinách pšenice různé typy stresu způsobené suchem, chladem, zvýšeným obsahem solí v půdě, nedostatkem vody nebo světla zvyšují aktivitu NADP-ME, avšak geny pro NADP-ME jsou transkribovány méně u všech typů stresu kromě solného stresu a stresu způsobeného nedostatkem světla [49]. Zvýšená aktivita NADP-ME byla zjištěna i u rostlin infikovaných virem (Y virus bramboru) [50].

2. Cíl práce

1. Provést rešerši rostlin využívaných k přípravě protinádorových léčiv a rostlin potenciálně vhodných k tomuto účelu.
2. V různých extraktech vybraných léčivých rostlin stanovit aktivitu NADP-dependentních enzymů (G6PDH, SDH, NADP-ICDH, NADP-ME), množství fenolických látek a flavonoidů.
3. Porovnat různé způsoby extrakce.

3. Materiál a metody

3.1. Chemikálie

2-amino-methyl-1-propanol - Sigma, USA

AlCl_3 - Lachema, ČR

D,L-isocitrát trisodný - Sigma, USA

D-glukosa-6-fosfát sodný - Sigma, USA

Folin-Coicalteauovo činidlo - Penta, ČR

KNO_2 - Fluka analytical, Německo

Kyselina askorbová - Sigma, USA

Kvercetin dihydrát - Riedel-de Haën, Německo

L-malát sodný - Sigma, USA

MgCl_2 - Sigma, USA

Na_2CO_3 - Lachema, ČR

NADP^+ - Sigma, USA

NaOH - Lachema, ČR

PVPP - Sigma, USA

Sacharosa - Penta, ČR

Šikimát sodný - Sigma, USA

Tris - Sigma, USA

3.2. Přístroje

Analytické váhy XE Series 100A - Denver Instrument Company, USA

Centrifuga UNIVERSAL 32R - Hettich Zentrifugen, Německo

Inkubátor se suchou lázní - Major Science, USA

Laboratorní váhy Kern 440-45 - Kern, Německo

Magnetická míchačka s ohřívacem RH basic - Labortechnik, Německo

Spektrofotometr Ultrospec 2100 - Amersham Pharmacia Biotech, Anglie

3.3. Rostlinný materiál

Allium sativum L. - Česnek kuchyňský, cibule

Aloe vera - Aloe pravá, listy

Melissa officinalis L. - Meduňka lékařská, listy

Mentha citrata - Máta citronová, listy

Mentha piperita L. - Máta peprná, listy

Ocimum basilicum L. - Bazalka pravá, listy

Raphanus sativus L. var. *niger* - Ředkev černá, kořen

Salvia officinalis L. - Šalvěj lékařská, listy

Urtica dioica L. - Kopřiva dvoudomá, listy

Zingiber officinale - Zázvor lékařský, kořen

Máta citronová, máta peprná, kopřiva, meduňka, šalvěj, česnek, bazalka a aloe byly získány z domácích zdrojů. Zázvor a ředkev byly zakoupeny v obchodním řetězci. Všechny rostliny byly skladovány při -80°C.

3.4. Metody

3.4.1. Metody extrakce rostlinného materiálu

3.4.1.1. Extrakce metodou PVPP I pro stanovení enzymové aktivity

Bylo naváženo přesně asi 300 mg rostlinného materiálu, který byl poté homogenizován ve třecí misce s trojnásobným množstvím pufru A, který obsahoval 100 mM Tris-HCl pufr pH 7,8; 1 mM DTT; 1mM EDTA a 5 mM MgCl₂. K homogenátu bylo přidáno asi 0,02 g PVPP a poté byl centrifugován 15 minut při 4°C a 15000 rpm (16 600 x g). Supernatant byl pipetován do mikrozkušavky typu Eppendorf.

3.4.1.2. Extrakce metodou PVPP II pro stanovení enzymové aktivity

Bylo naváženo přesně asi 300 mg rostlinného materiálu, který byl poté homogenizován ve třecí misce s pufrem A (složení viz 3.4.1.1), který dále obsahoval 0,01 M kyselinu askorbovou a 0,15 M sacharosu, a PVPP. Množství PVPP bylo shodné s navázkou rostlinného materiálu. Pufru A byl přidán trojnásobek součtu navážky rostlinného materiálu a navážky PVPP, tzn. na 300 mg navážky bylo použito 300 mg PVPP a 1,8 ml extrakčního pufru A. Homogenizát byl centrifugován 15 minut při 4°C a 15000 rpm (16 600 x g). Supernatant byl pipetován do mikrozkušavky typu Eppendorf.

3.4.1.3. Extrakce methanolem

Bylo naváženo přesně asi 1,25 g rostlinného materiálu, který byl homogenizován ve třecí misce s 25 ml 80% methanolu. Celý obsah byl kvantitativně převeden do uzavíratelné Erlenmayerovy baňky, kde byl rostlinný materiál extrahován do methanolu po dobu 24 hodin. Poté byl vzorek centrifugován 10 minut při 4°C a 9000 rpm (9400 x g). Supernatant byl následně filtrován přes 4 vrstvy gázy a poté přes jednorázový stříkačkový filtr Schleier&Schuell o velikosti pórů 0,2 µm.

3.4.1.4. Extrakce horkou vodou

Byl navážen přesně asi 1 g rostlinného materiálu. Vzorek byl homogenizován ve třecí misce s 20 ml destilované vody. Celý obsah byl kvantitativně převeden

do Erlenmayerovy baňky. Vše bylo zahřáto na 80°C a udržováno při této teplotě po dobu 20 minut. Po vychladnutí byl vzorek centrifugován 10 minut při 4°C a 9000 rpm (9400 x g). Supernatant byl následně filtrován přes 4 vrstvy gázy a poté přes jednorázový stříkačkový filtr Schleier&Schuell o velikosti pórů 0,2 µm.

3.4.2. Stanovení enzymové aktivity

Stanovení aktivity NADP-dependentních enzymů spektrofotometricky je umožněno díky rozdílnému absorpčnímu spektru redukované a oxidované formy koenzymu NADP⁺. Redukovaný koenzym má ve svém spektru maximum při 340 nm, které oxidovaná forma koenzymu nemá [51]. Enzymová aktivita NADP-ME, SDH, NADP-ICDH a G6PDH byla stanovena kinetickým měřením 1 ml reakční směsi při 340 nm po dobu 3 minut na spektrofotometru Ultrospec 2100. Jednotlivé složky reakční směsi kromě enzymu byly pipetovány do mikrozkušavek, které byly poté vloženy do termostatu nastaveného na 36°C. Po zahřátí byl obsah mikrozkušavky převeden do kyvety (o délce 1 cm) a reakce byla iniciována 50 µl extraktu získaného extrakcí PVPP I nebo PVPP II. Nárůst absorbance za dobu měření byl přepočítán na aktivitu podle vzorce:

$$a = \frac{\Delta A \cdot V_t \cdot 1000}{\epsilon \cdot l \cdot t \cdot V_e} \text{ (}\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}\text{)},$$

kde a značí aktivitu, ΔA rozdíl absorbance, V_t celkový objem reakční směsi, V_e objem extraktu, ϵ molární absorpční koeficient NADP(H) ($6200 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$) a l délku kyvety v cm. Aktivita pak byla vztažena na čerstvou hmotu rostlinného materiálu podle vzorce:

$$a (F.W.) = a \frac{V_p}{m} \text{ (}\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ F.W.)},$$

kde V_p je objem pufru v ml a m navážka rostlinného materiálu v gramech.

3.4.2.1. Složení reakční směsi pro stanovení aktivity G6PDH

Reakční směs pro stanovení aktivity G6PDH obsahovala 100 mM Tris-HCl pufr pH 7,6; 5 mM D-glukosa-6-fosfát; 2 mM MgCl₂; 0,2 mM NADP⁺.

3.4.2.2. Složení reakční směsi pro stanovení aktivity SDH

Reakční směs pro stanovení aktivity SDH obsahovala 100 mM 2-amino-2-methyl-1-propanol pufr pH 9; 3 mM šikimát; 0,2 mM NADP⁺.

3.4.2.3. Složení reakční směsi pro stanovení aktivity NADP-ICDH

Reakční směs pro stanovení aktivity NADP-ICDH obsahovala 100 mM Tris-HCl pufr pH 7,4; 2 mM D,L-isocitrát; 2 mM MgCl₂; 0,2 mM NADP⁺.

3.4.2.4. Složení reakční směsi pro stanovení aktivity NADP-ME

Reakční směs pro stanovení aktivity NADP-ME obsahovala 100 mM Tris-HCl pufr pH 7,4; 10 mM L-malát; 2 mM MgCl₂; 0,2 mM NADP⁺.

3.4.3. Stanovení celkového množství fenolických látek

Nejběžnější metoda stanovení fenolických látek je metoda využívající Folin-Coicalteuovo činidlo (FCR). Metoda je založena na redukci fosfowolframanového-fosfomolybdenanového komplexu na modrý produkt [52], jehož absorbance je pak měřena při 760 nm.

Ke 200 µl (1x, 2x, 5x nebo 10x ředěného) extraktu získaného methanолоvou extrakcí nebo extrakcí horkou vodou byl přidán 1 ml 10% Folin-Coicalteuova činidla a 800 µl 7,5% Na₂CO₃. Po půl hodině byla měřena absorbance při 760 nm proti slepému pokusu, který obsahoval 1 ml 10% roztoku Folin-Coicalteuova činidla a 800 µl 7,5% Na₂CO₃ a 200 µl destilované vody. Absorbance byla pomocí kalibrační křivky přepočítána na koncentraci fenolických látek v roztoku.

3.4.4. Kalibrační křivka pro stanovení celkového množství fenolických látek

Bylo připraveno 5 roztoků fenolu o výsledných koncentracích 2,75 mmol/l, 1,38 mmol/l, 0,69 mmol/l, 0,34 mmol/l a 0,17mmol/l. K 200 µl roztoku byl přidán 1 ml 10% Folin-Coicalteuova činidla a 800 µl 7,5% Na₂CO₃. Po půl hodině byla měřena absorbance při 760 nm proti slepému pokusu, kde byl roztok fenolu nahrazen destilovanou vodou.

Výsledná absorbance roztoků byla měřena při vlnové délce 760 nm. Ze získaných hodnot byl sestrojen graf závislosti absorbance roztoku na koncentraci fenolu.

3.4.5. Stanovení celkového množství flavonoidů

Kvantitativní stanovení flavonoidů bylo prováděno kolorimetrickou metodou. Metoda využívající chlorid hlinitý je vhodná především pro stanovení flavonů a flavonolů. Tato metoda je založena na tvorbě komplexu hlinitého iontu s karbonylovou a hydroxylovou skupinou flavonoidů [53].

Do zkumavky bylo pipetováno 250 μ l extraktu získaného methanolovou extrakcí nebo extrakcí horkou vodou. Dále bylo pipetováno 1,25 ml destilované vody a 75 μ l 5% KNO_2 . Po 6 minutách bylo do zkumavky pipetováno 150 μ l 10% AlCl_3 . Po dalších 5 minutách bylo do zkumavky pipetováno 0,5 ml 1M NaOH. Obsah zkumavky byl doplněn destilovanou vodou do objemu 2,5 ml. Absorbance byla měřena při vlnové délce 510 nm proti slepému pokusu, ve kterém byl extrakt nahrazen destilovanou vodou.

3.4.6. Kalibrační křivka pro stanovení celkového množství flavonoidů

Byly připraveny 4 roztoky kvercetinu v ethanolu o výsledných koncentracích 2,96 mmol/l; 1,48 mmol/l; 0,74 mmol/l a 0,37 mmol/l. Do zkumavky bylo pipetováno 250 μ l roztoku, 1,25 ml destilované vody a 75 μ l 5% KNO_2 . Po 6 minutách bylo do zkumavky pipetováno 150 μ l 10% AlCl_3 . Po dalších 5 minutách bylo do zkumavky pipetováno 0,5 ml 1M NaOH. Obsah zkumavky byl doplněn destilovanou vodou do objemu 2,5 ml. Výsledná absorbance roztoků byla měřena při vlnové délce 510 nm proti slepému pokusu, ve kterém byl kvercetin nahrazen destilovanou vodou.

4. Výsledky

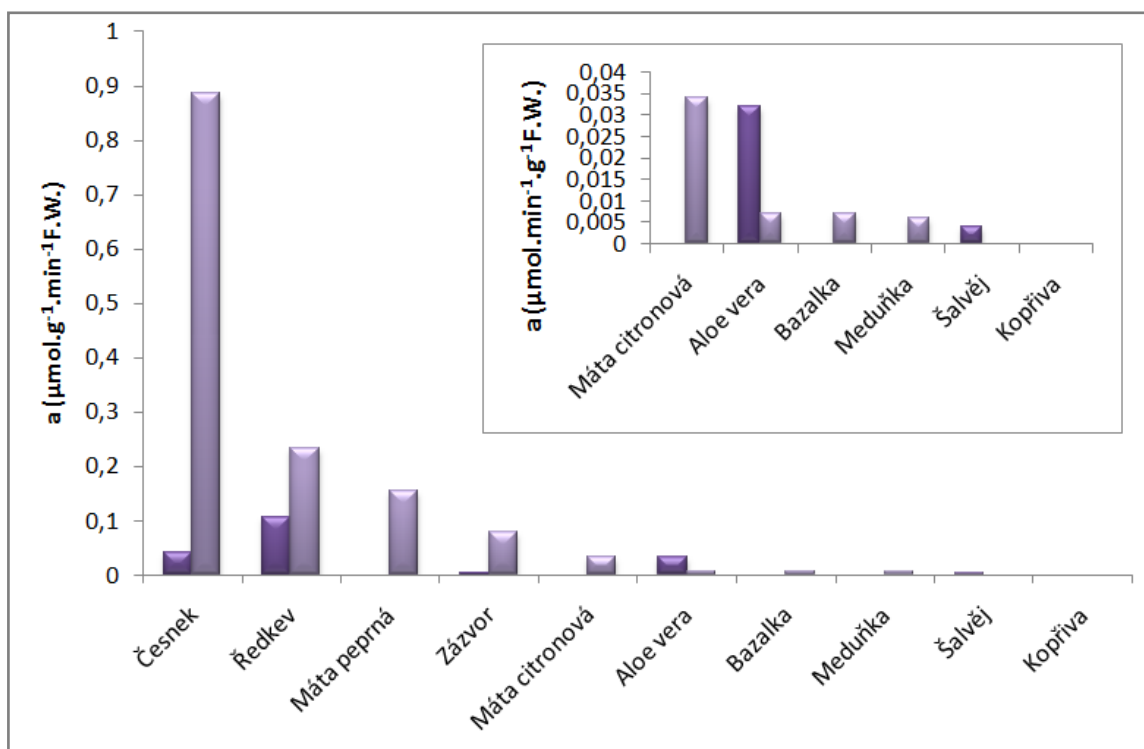
Pro sledování aktivit NADP-dependentních enzymů (G6PDH, SDH, NADP-ICDH a NADP-ME) a obsahu fenolických látek a flavonoidů bylo vybráno 10 léčivých rostlin běžně dostupných v České republice - česnek kuchyňský (cibule), aloe vera (listy), máta peprná (listy), máta citronová (listy), meduňka lékařská (listy), bazalka pravá (listy), šalvěj lékařská (listy), ředkev černá (kořen), kopřiva dvoudomá (listy) a zázvor lékařský (kořen). Účinky těchto léčivých rostlin byly podrobně popsány v kapitole 1.3 (str. 10).

4.1. Aktivita studovaných enzymů v různých léčivých rostlinách

Nejprve bylo nutné najít vhodný způsob extrakce enzymů. Vzhledem k tomu, že léčivé rostliny obsahují velké množství fenolických látek, musel být oproti běžnému postupu optimalizován ještě druhý způsob extrakce. Jednak byla tedy použita extrakční metoda, která se běžně používá pro přípravu rostlinného extraktu pro stanovení enzymových aktivit (viz 3.4.1.1, str. 24), dále označována jako PVPP I, jednak byla extrakce PVPP I obohacena o přítomnost sacharosy, kyseliny askorbové a o podstatně větší množství ve vodě nerozpustného PVPP (metoda PVPP II). Tyto látky by měly eliminovat fenolické látky rušící enzymové stanovení [54]. Použité koncentrace jsou uvedeny v metodách (viz 3.4.1.2, str. 24).

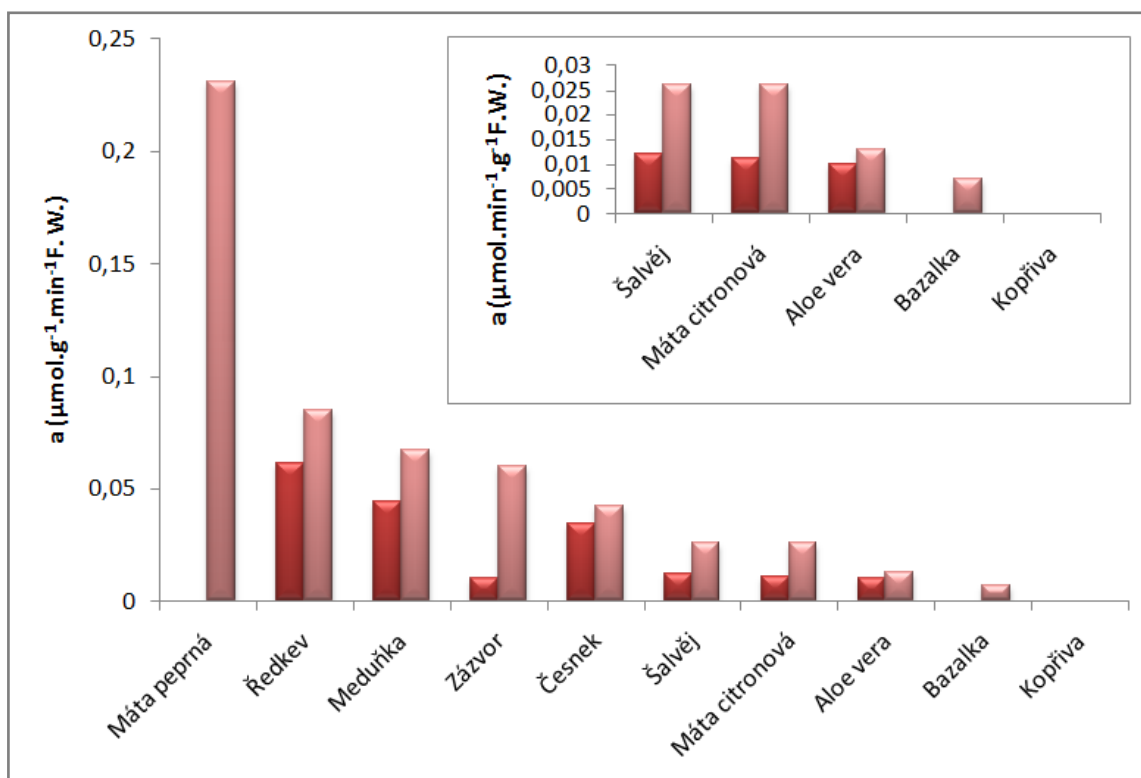
Z grafů na obr. 6 (str. 29) – obr. 9 (str. 32) vyplývá, že až na několik málo případů, byla extrakce PVPP II účinnější. Pouze pro stanovení aktivity G6PDH aloe vera, aktivity NADP-ICDH meduňky a aktivity NADP-ME šalvěje, zázvoru a aloe vera byla účinnější extrakce PVPP I.

Nejvyšší aktivita G6PDH byla stanovena v extraktech z česneku, ředkve a máty peprné. Porovnání aktivit G6PDH ve sledovaných rostlinách extrahovaných metodou PVPP I a PVPP II je zobrazeno na obr. 6 (str. 29).



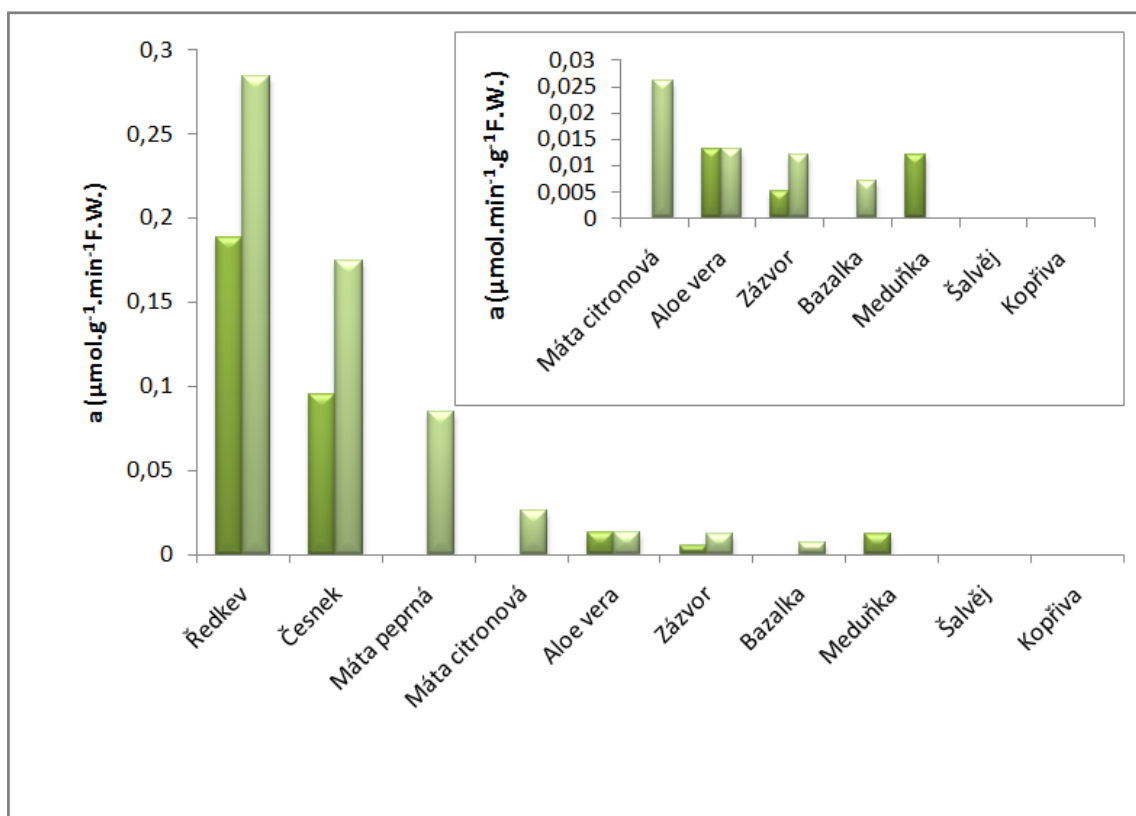
Obr. 6: Aktivita G6PDH vztažena na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu v extraktech získaných metodou PVPP I (■) v porovnání s aktivitou v extraktech získaných metodou PVPP II (■). Vložený graf má nižší měřítko a ilustruje tak nižší aktivity.

Nejvyšší aktivita SDH byla zjištěna v extraktu z máty peprné. U ostatních léčivých rostlin byla aktivita SDH o poznání nižší, jak je patrné na obrázku obr. 7 (str. 30).



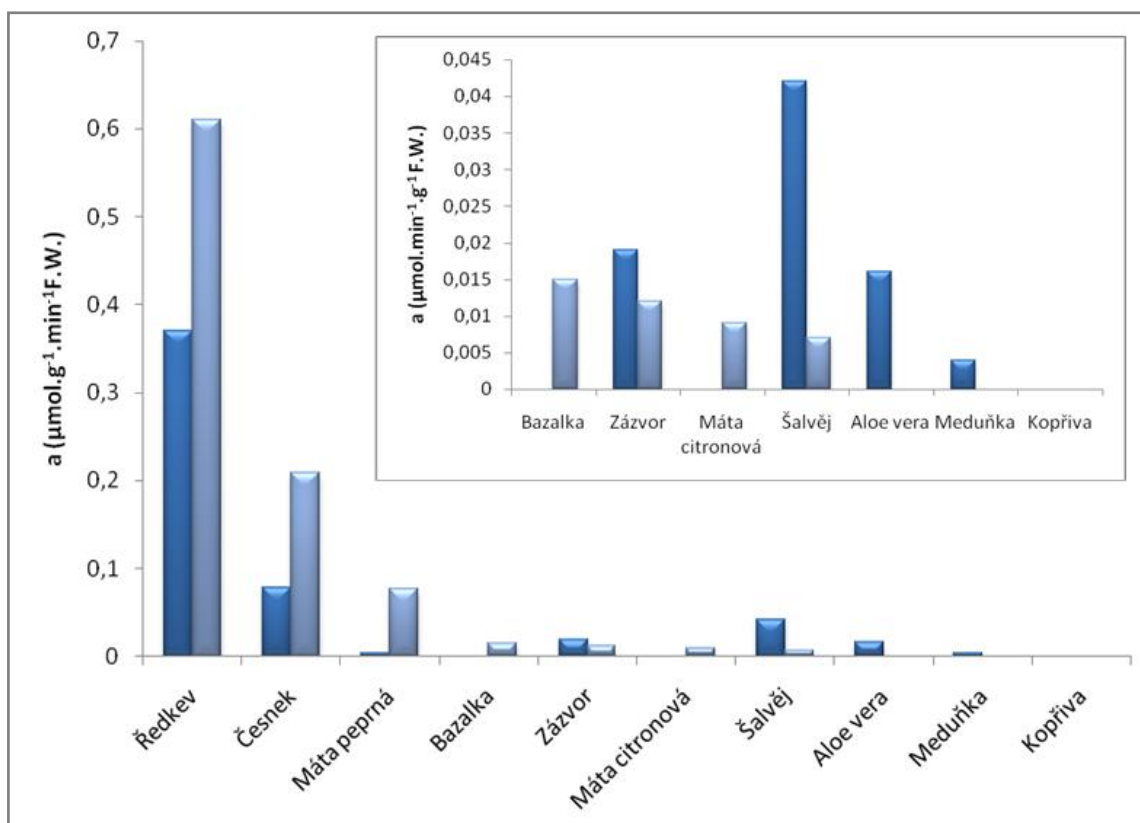
Obr. 7: Aktivita SDH vztažena na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu v extraktech získaných metodou PVPP I (■) v porovnání s aktivitou v extraktech získaných metodou PVPP II (□). Vložený graf má nižší měřítko a ilustruje tak nižší aktivity.

Porovnání aktivity NADP-ICDH ve sledovaných rostlinách je znázorněno na obr. 8 (str. 31). Extrakty z ředkve, česneku a máty peprné získané metodou PVPP II vykazovaly nejvyšší aktivitu NADP-ICDH. Naopak šalvěj a meduňka nevykazovaly aktivitu v žádném z extraktů.



Obr. 8: Aktivita NADP-ICDH vztažena na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu v extraktech získaných metodou PVPP I (■) v porovnání s aktivitou v extraktech získaných metodou PVPP II (■). Vložený graf má nižší měřítko a ilustruje tak nižší aktivity.

Z obr. 9 (str. 32) je patrné, že nejvyšší aktivita NADP-ME byla stanovena v extraktech z ředkve, česneku a máty pepné připravených metodou PVPP II. Hodnoty aktivit NADP-ME ostatních léčivých rostlin byly téměř zanedbatelné.

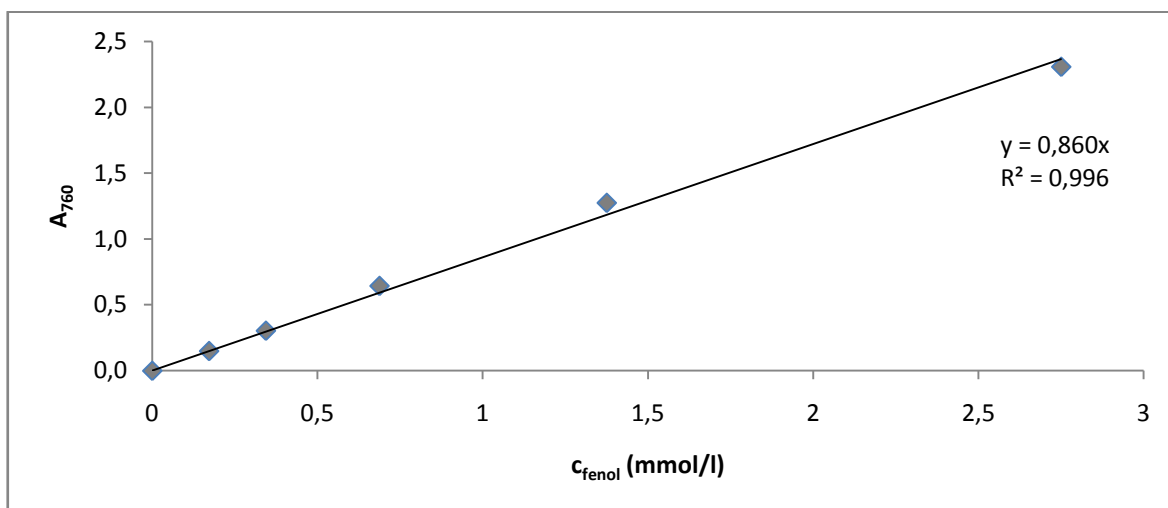


Obr. 9: Aktivita NADP-ME vztažena na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu v extraktech získaných metodou PVPP I (■) v porovnání s aktivitou v extraktech získaných metodou PVPP II (■). Vložený graf má nižší měřítko a ilustruje tak nižší aktivity.

Z obr. 6 (str. 29) – obr. 9 (str. 32) je patrné, že enzymová aktivita významně závisí na způsobu extrakce. Nejvíce je rozdíl ve způsobu extrakce patrný na extraktech z máty peprné. Extrakt získaný metodou PVPP II vykazoval nejvyšší aktivitu SDH mezi všemi rostlinami, zatímco v extraktu získaném metodou PVPP I byla aktivita SDH neměřitelná. Obdobně i další sledované enzymy měly v extraktu máty získaném metodou PVPP I nulovou aktivitu.

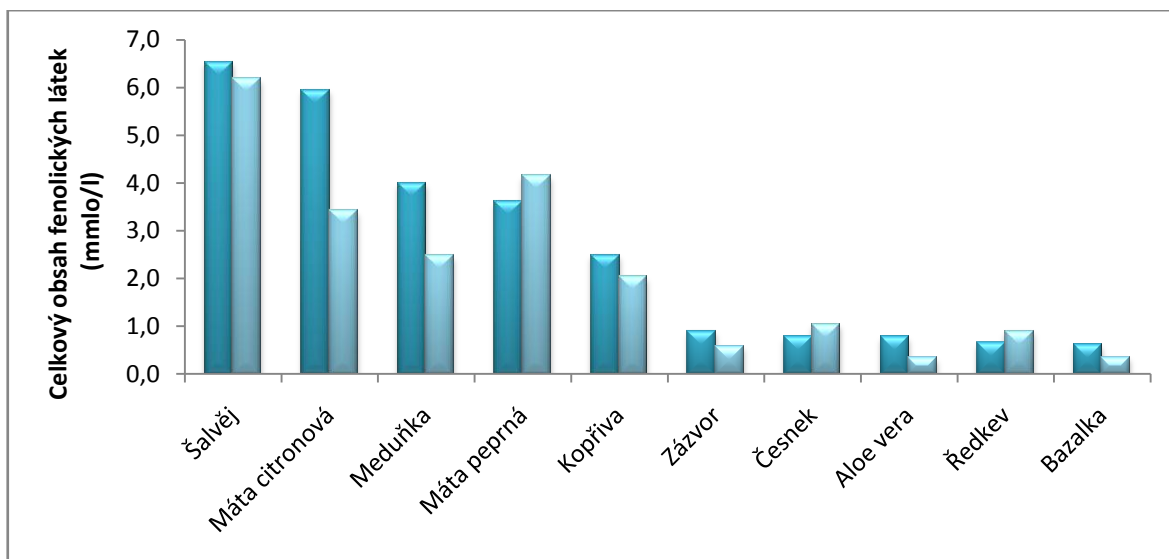
4.2. Stanovení celkového množství fenolických látek

Postupem popsaným v kapitole 3.4.4 (str. 26) byly získány hodnoty, které byly využity pro sestavení grafu závislosti absorbance roztoku na koncentraci fenolu (obr. 10). Rovnice regrese této kalibrační křivky byla použita pro výpočet celkového obsahu fenolických látek, který byl vyjádřen v ekvivalentech fenolu.



Obr. 10: Graf závislosti absorbance roztoku na koncentraci fenolu.

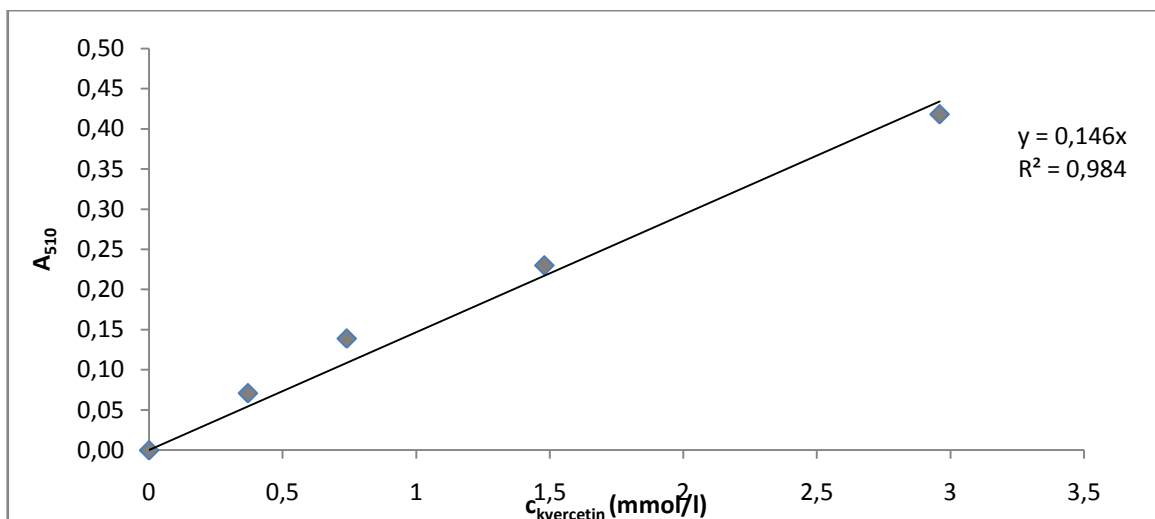
Pro stanovení množství fenolických látek a flavonoidů byly využity další 2 metody extrakce, a to methanolvá extrakce po dobu 24 hodin a 21°C a 20 minutová extrakce 80°C horkou destilovanou vodou. Na obr. 11 (str. 34) je zobrazeno porovnání způsobu extrakce fenolických látek horkou vodou a methanolem. Ve většině případů je extrakce metanolem účinnější, a to pro šalvěj, mátu citronovou, meduňku, kopřivu, zázvor, aloe a bazalku. Pro mátu peprnou, česnek a ředkev byla naopak výhodnější extrakce v horké vodě. Nejvyšší obsah fenolických látek byl stanoven v šalvěji, mátě citronové a v meduňce. Množství fenolických látek je vyjádřeno v ekvivalentech fenolu. Jako standard byl použit fenol o koncentraci 0-2,75 mmol/l.



Obr. 11: **Porovnání způsobu extrakce fenolických látek.** Extrakce byla prováděna v horké vodě (■) a v 80% MetOH (■). Celkový obsah fenolických látek je vztažen na ekvivalent fenolu.

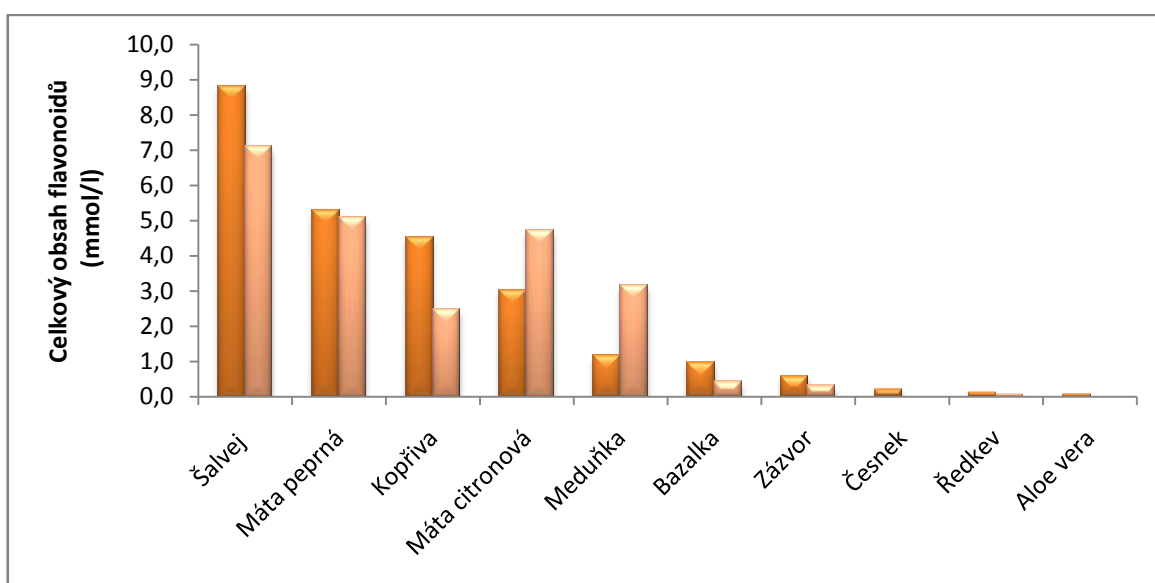
4.3. Stanovení celkového množství flavonoidů

V extraktech získaných methanолоvou extrakcí po dobu 24 hodin při laboratorní teplotě a 20 minutovou extrakcí horkou destilovanou vodou při 80°C bylo provedeno také stanovení celkového množství flavonoidů. Postupem popsáním v kapitole 3.4.6 (str. 27) byly získány hodnoty kalibrační přímky závislosti absorbance roztoku na koncentraci kvercetinu (obr. 12, str. 35). Rovnice regrese byla použita pro výpočet celkového obsahu flavonoidů, který byl vyjádřen v ekvivalentech kvercetinu.



Obr. 12: Graf závislosti absorbance roztoku na koncentraci kvercetinu.

Na obr. 13 je znázorněno porovnání obsahu flavonoidů v extraktech připravených extrakcí horkou vodou a metanolem. Extrakce metanolem byla účinnější v případě šalvěje, kopřivy, bazalky, zázvoru a česneku. Nejvyšší obsah flavonoidů byl stanoven v šalvěji, máté peprné a kopřivě. Množství flavonoidů je vztaženo na ekvivalent kvercetinu.



Obr. 13: Porovnání způsobu extrakce flavonoidů. Extrakce byla prováděna v horké vodě (■) a v 80% MetOH (■). Celkový obsah flavonoidů je vztažen na ekvivalent kvercetinu.

5. Diskuse

Rostliny byly k léčbě různých nemocí využívány od dávných dob. Vzhledem k tomu, že některé nemoci jsou stále nevyléčitelné, hledání účinných látek z rostlin stále pokračuje. Avšak kritéria, podle kterých dané rostliny vybírat, jsou těžko předvídatelná. Obvykle se sleduje obsah sekundárních metabolitů, které bývají účinnými látkami. Provádí se stanovení celkového obsahu fenolických látek, flavonoidů, taninů, dále pak stanovení antioxidační aktivity a schopnost redukovat volné radikály [7, 14, 20, 26]. Sekundární metabolity se separují a identifikují pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie v kombinaci s UV/VIS nebo hmotnostním detektorem. V této bakalářské práci však byl využit přístup jiný. Vedle stanovení celkových fenolických látek a flavonoidů byla rovněž sledována aktivita enzymů poskytujících NADPH (G6PDH, NADP-ICDH a NADP-ME) a enzymu klíčového v biosyntéze fenylpropanoidů (SDH). NADPH je důležitým koenzymem a redukantem při mnoha syntetických drahách. Podílí se například na syntéze isoprenoidů, fenolických látek, monolignolů vedoucích k syntéze ligninů a lignanů, aminokyselin či mastných kyselin. Tento koenzym je také důležitý v obraných odpovědích rostliny vůči stresu. Je známo, že i syntéza sekundárních metabolitů může být ve stresových podmínkách zvýšena [47].

Aktivita NADP-dependentních enzymů byla stanovována v extraktech z 10-ti léčivých rostlin běžně dostupných v České republice. V některých případech bylo stanovení enzymové aktivity v rostlinách rušeno, pravděpodobně přítomností fenolických látek. V mnoha případech to však neznamena, že by v těchto rostlinách sledované enzymy nebyly aktivní. Proto byl vedle běžného postupu, ve kterém byl standardní extrakční pufr a malé množství PVPP (metoda PVPP I), využit i postup, ve kterém byl standardní pufr obohacen o sacharosu a kyselinu askorbovou a extrakce o zvýšené množství PVPP (metoda PVPP II). Tento postup by měl množství fenolických látek v extraktu snižovat [54]. Pro stanovení enzymové aktivity byly tedy použity extrakce PVPP I a PVPP II a pro stanovení fenolických látek a flavonoidů byly použity extrakce horkou vodou, která simuluje čajové nálevy, a extrakce 80% MetOH. Nejvyšší aktivitu NADP-dependentních enzymů měla ředkev, ačkoliv není typická léčivá rostlina, česnek a máta peprná, pro které vyhovovala metoda extrakce PVPP II podobně jako pro většinu ostatních rostlin. Tab. 1

uvádí, pro které rostliny a pro které enzymy byla vhodnější metoda extrakce PVPP I a pro které metoda PVPP II. U některých rostlin, např. u aloe vera, bazalky a šalvěje, byly rozdíly mezi oběma extrakčními metodami malé. Aktivita některých enzymů stále nebyla měřitelná, např. v extraktech kopřivy. Zůstává tedy otázkou, zda je jejich aktivita v dané rostlině opravdu tak nízká, nebo zda je třeba metodu extrakce stále optimalizovat, např. eliminací taninů, které při vysokých koncentracích aktivitu enzymů snižují [55], nebo šťavelanů, které mohou mít na enzymy jak pozitivní, tak negativní vliv [56, 57]. V příští práci by kromě NADP-dependentních dehydrogenas bylo zajímavé sledovat i aktivity dalších enzymů podílejících se na biosyntéze sekundárních metabolitů např. fenylalaninamoniolyasy, chalkosynthasy a stilbensynthasy.

Tab. 1: Přehled extrakčních metod, které jsou pro stanovení daných enzymů, respektive celkových fenolických látek a flavonoidů vhodnější. I, extrakční metoda PVPP I; II, extrakční metoda PVPP II; MetOH, 24 hodinová methanolvá extrakce; H₂O, extrakce 80°C vodou 20 minut; N/A, neměřitelná aktivita

	G6PDH	SDH	NADP-ICDH	NADP-ME	Fenol. látky	Flavonoidy
Aloe vera	I	II	I=II	I	MetOH	MetOH
Bazalka	II	II	II	II	MetOH	MetOH
Česnek	II	II	II	II	MetOH	H ₂ O
Kopřiva	N/A	N/A	N/A	N/A	MetOH	MetOH
Máta peprná	II	II	II	II	MetOH	H ₂ O
Máta citronová	II	II	II	II	H ₂ O	MetOH
Meduňka	II	II	I	II	H ₂ O	MetOH
Ředkev	II	II	II	II	MetOH	H ₂ O
Šalvěj	I	II	II	I	MetOH	MetOH
Zázvor	II	II	II	I	MetOH	MetOH

Také celkový obsah fenolických látek a flavonoidů stanovený v extraktech připravených methanolvou extrakcí nebo extrakcí horkou vodou byl v případě Aloe vera a česneku neměřitelný a v dalších případech nízký, např. v zázvoru a ředkvi (obr. 11, str. 34 a obr. 13, str. 35). Bylo by tedy vhodné použít i jiné extrakční metody např. extrakci dalšími organickými rozpouštědly: ethanol, chloroformem, hexanem a jinými nebo

mikrovlnnou extrakci. Kromě toho Folin-Coicalteuova metoda pro stanovení fenolických látek není dostatečně specifická. FCR barevně reaguje s dalšími redukčními látkami, mezi které patří kyselina askorbová nebo aromatické aminy [53]. Pro separaci a identifikaci sekundárních metabolitů se dále používají NMR analýza s radioaktivně značeným ^{31}P , Ramannova spektroskopie, kapilární elektroforéza či chemiluminiscence. Nejvyšší obsah fenolických látek a flavonoidů byl zjištěn v šalvěži, mátě citronové i peprné, meduňce a kopřivě. Tyto rostliny by tedy byly vhodné pro další studium jednotlivých flavonoidů a jejich účinků. Je však možné, že léčivé účinky rostlin mohou spočívat v kombinaci více látek obsažených v rostlině. Stejně tak bude pravděpodobně záležet na koncentraci účinné látky, což by ukázaly navazující biologické pokusy spočívající v testování rostlinných extraktů na různých nádorových buněčných liniích. Pro většinu rostlin byla účinnější methanolvá extrakce, i když methanol by byl pro buněčné linie toxický. Z tohoto pohledu jsou zajímavé rostliny meduňka a máta citronová, které vykazovaly vyšší obsah fenolických látek a flavonoidů po extrakci horkou vodou než po extrakci methanolem. Avšak i vodné extrakty šalvěže a máty peprné měly vysoký obsah těchto látek. Vzhledem k tomu, že u máty, šalvěže a česneku již byla zjištěna souvislost s protirakovinným působením (orální podání extraktu máty snižovalo výskyt myší kožní karcinogeneze iniciované DMBA [58]; olej z šalvěže měl cytotoxický účinek vůči buněčné linii lidského karcinomu dutiny ústní [59]; látky obsažené v česneku vykazovaly antiproliferační účinky, způsobené indukci apoptosy nebo pozměněním buněčného cyklu, v tumorových buněčných liniích [16]), bylo by zajímavé sledovat působení extraktů těchto rostlin i na jiných nádorových liniích.

6. Závěr

1. V 10 vybraných léčivých rostlinách extrahovaných 2 způsoby lišících se především v množství PVPP byla porovnána aktivita NADP-dependentních enzymů (G6PDH, SDH, NADP-ICDH, NADP-ME) a také obsah fenolických látek a flavonoidů v methanolovém a vodném extraktu.
2. Nejvyšší aktivitu NADP-dependentních enzymů vykazovaly extrakty ředkve, česneku, máty peprné, nejvyšší množství flavonoidů a fenolických látek obsahovaly extrakty šalvěje, meduňky a máty citronové.

7. Seznam použité literatury

1. Cragg, G. M., Newman, D. J.: J. Ethnopharmacol. 100, 72-79 (2005)
2. Balunas, M. J., Kinghorn, A. D.: Life Sci. 78, 431-441 (2005)
3. van Der Heijden, R., Jacobs, D. I., Snoeijer, W., Hallard, D., Verpoorte, R.: Curr. Med. Chem. 11, 607-628 (2004)
4. Okouneva, T., Hill, B. T., Wilson, L., Jordan, M. A.: Mol. Cancer Ther. 2, 427-436 (2003)
5. Gordaliza, M., García, P. A., Miguel de Corral, J. M., Castro, M. A., Gómez-Zurita, M. A.: Toxicon 44, 441-459 (2004)
6. Horwitz, S. B.: J. Nat. Prod. 67, 136-138 (2004)
7. Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., Corke, H.: Life Sci. 74, 2157-2184 (2004)
8. Mi, Q., Cui, B., Silva, G. L., Lantvit, D., Lim, E., Chai, H., You, M., Hollingshead, M. G., Mayo, G. M., Kinghorn, A. D., Pezzuto, J. M.: Cancer Res. 1, 4030-4037 (2001)
9. Aggarwal, B. B., Bhardwaj, A., Aggarwal, R. S., Seeram, N. P., Shishoda, S., Takada, Y.: Anticancer Res. 24, 2783-2840 (2004)
10. Siriwatanametanon, N., Fiebich, B. L., Efferth, T., Prieto, J. M., Heinrich, M.: J. Ethnopharmacol. 130, 196-207 (2010)
11. Costa-Lotufo, L. V., Khan, M. T. H., Ather, A., Wilke, D. V., Jimenez, P. C., Pessoa, C., de Moraes, M. E. A., de Moraes M. O.: J. Ethnopharmacol. 99, 21-30 (2005)
12. Mbaveng, A. T., Kuete, V., Mapunya, B. M., Beng, V. P., Nkengfack, A. E., Meyer, J. J. M., Lall, N.: Environ. Toxicol. Phar. 32, 162-167 (2011)

13. Goun, E. A., Petrichenko, V. M., Solodnikov, S. U., Suhinina, T. V., Kline, M. A., Cunningham, G., Nguyen, Ch., Miles, H.: *J. Ethnopharmacol.* 81, 337-342 (2002)
14. Bouayed, J., Piri, K., Rammal, H., Dicko, A., Desor, F., Younos, Ch., Soulimani, R.: *Food Chem.* 104, 364-368 (2007)
15. Harris, J. C., Cottrell, S. L., Plummer, S., Lloyd, D.: *Appl Microbiol. Biot.* 57, 282-286 (2001)
16. Omar, S. H., Al-Wabel, N. A.: *Saudi Pharm. J.* 18, 51-58 (2010)
17. Benkeblia, N.: *Lebensm.-Wiss. u. Technol.* 37, 263-268 (2004)
18. Nomaguchi, K., Tanaka, M., Misawa, E., Yamada, M., Toida, T., Iwatsuki, K., Goto, T., Kawada T.: *Obes. Res. Clin. Pract.* 5, 190-201 (2011)
19. Vázquez, B., Avila, G., Segura, D., Escalante, B.: *J. Ethnopharmacol.* 55, 69-75 (1996)
20. Akhondzadeh, S., Noroozian, M., Mohammadi, M., Ohadinia, S., Jamshidi, A. H., Khani, M.: *J. Neurol. Neurosur. Ps.* 74, 863-866 (2003)
21. de Sousa, A. C., Alviano, D. S., Blank, A. F., Alves, P. B., Alviano, C. S., Gattass, C. R.: *J. Pharmacy Pharmacol.* 56, 677-681 (2004)
22. Vidal, F., Vidal, J. C., Gadelha, A. P. R., Lopes, C. S., Coelho, M. G. P., Monteiro-Leal, L. H.: *Exp. Parasitol.* 115, 25-31 (2007)
23. Kumar, P., Mishra, S., Malik, A., Satya, S.: *Ind. Crops Prod.* 39, 106-112 (2012)
24. Hussain, A. I., Anwar, F., Sherazi, S. T. H., Przybylski, R.: *Food Chem.* 108, 986-995 (2008)
25. Lugasi, A., Dworschák, E., Kéry, Á.: *Phytother. Res.* 12, 502-506 (1998)

26. Akhondzadeh, S., Noroozian, M., Mohammadi, M., Ohadinia, S., Jamshidi, A. H., Khani, M.: *J. Clin. Pharm. Ther.* 28, 53-59 (2003)
27. Baricevic, D., Sosa, S., Loggia, R. D., Tubaro, A., Simonovska, B., Krasna, A., Zupancic, A.: *J. Ethnopharmacol.* 75, 125-132 (2001)
28. Lu, Y., Yeap Foo, L.: *Food Chem.* 75, 197-202 (2001)
29. Reihemann, K., Behnke, B., Schulze-Osthoff, K.: *FEBS Lett.* 442, 89-94 (1999)
30. Thomson, M., Al-qattan, K. K., Al-Sawan, S. M., Alnaqeeb, M. A., Khan, I., Ali, M.: *Prosta. Leukotr. Ess.* 67, 475-478 (2002)
31. Ali, B. H., Blunden, G., Tanira, M. O., Nemmar, A.: *Food. Chem. Toxicol.* 46, 409-420 (2008)
32. Kong, W. F., Chen, J. Y., Hou, Z. X., Wen, P. F., Zhan, J. Ch, Pan, Q. H., Huang, W.D: *J. Plant Physiol.* 164, 934-944 (2007)
33. Scharte, J., Schon, H., Tjaden, Z., Weis, E., von Schaewen, A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 8061-8066 (2009)
34. Smiri, M., Chaoui, A., El Ferjani, E.: *J. Plant Physiol.* 166, 259-269 (2009)
35. Valderrama, R., Corpas, F. J., Carreras, A., Gomez-Rodriguez, M. V., Chaki, M., Pedrajas, J. R., Fernandez-Ocana, A., Del Rio, L. A., Barroso, J. B.: *Plant Cell Environ.* 29, 1449-1459 (2006)
36. Herrmann, K. M.: *Plant Cell* 7, 907-919 (1995)
37. Ding, L., Hofius, D., Hajirezaei, M. R., Fernie, A. R., Bornke, F., Sonnewald, U.: *J. Exp. Bot.* 58, 2053-2067 (2007)
38. Wang, C., Lu, J., Zhang, S., Wang, P., Hou, J., Qian, J.: *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 1297-1303 (2011)

39. Moura, J. C., Bonine, C. A., de Oliveira Fernandes Viana, J., Dornelas, M. C., Mazzafera, P.: J. Integr. Plant Biol. 52, 360-376 (2010)
40. Mhamdi, A., Mauve, C., Gouia, H., Saindrenan, P., Hodges, M., Noctor, G.: Plant Cell Environ. 33, 1112-1123 (2010)
41. Hodges, M., Flesch, V., Gálvez, S., Bismuth, E.: Plant Physiol. Bioch. 41, 577-585 (2003)
42. Gálvez, S., Gadal, P.: Plant Sci. 105, 1-14 (1995)
43. Doubnerová, V., Ryšlavá, H.: Plant Sci. 180, 575–583 (2011)
44. Drincovich, M. F., Casati, P., Andreo, C. S.: FEBS Lett. 490, 1-6 (2001)
45. Gerrard Wheeler, M. C., Arias, C. L., Tronconi, M. A., Maurino, V. G., Andreo, C. S., Drincovich, M. F.: Plant Mol. Biol. 67, 231-242 (2008)
46. Voll, L. M., Zell, M. B., Engelsdorff, T., Sauri, A., Wheeler, M. G., Drincovich, M. F., Weber, A. P. M., Maurino, V. G.: New Phytol. doi: 10.1111/j.1469-8137.2012.04129.x (2012)
47. Heldt, H. W., Piechulla, B., Heldt, F.: Plant Biochemistry 4. vydání, Academic Press, Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo (2011)
48. Smeets, K., Cuypers, A., Lambrechts, A., Semane, B., Hoet, P., Van Laere, A., Vangronsveld, J.: Plant Physiol. Biochem. 43, 437-444 (2005)
49. Fu, Z. Y., Zhang, Z. B., Liu, Z. H., Hu, X. J., Xu, P.: Biol. Plant 55, 196-200 (2011)
50. Doubnerová, V., Müller K., Čerovská, N., Synková, H., Spoustová, P., Ryšlavá, H.: Int. J. Mol. Sci. 10, 3583-3598 (2009)
51. Kolektiv: Biochemie, skriptum PřF UK Praha, str. 44 (2009)

52. Stalikas, C. D.: J. Sep. Sci. 30, 3268-3295 (2007)
53. Alvarez-Suarez, J. M., Tulipani, S., Romandini, S., Vidal, A., Battino, M.: Curr. Anal. Chem. 5, 293-302 (2009)
54. Croteau, R., Karp, F.: Arch. Biochem. Biophys. 198, 512-522 (1979)
55. Okuda, T.: Phytochemistry 66, 2012-2031 (2005)
56. Zheng, X., Ye, L., Jiang, T., Jing, G., Li, J.: Food Chem. 130, 279-285 (2012)
57. Satô, M.: Plant Sci. Lett. 16, 355-360 (1979)
58. Samarth, R. M., Kumar, A.: Indian J. Exp. Biol. 41, 229-37 (2003)
59. Sertel, S., Eichhorn, T., Plinkert, P. K., Efferth, T.: Anticancer Res. 31, 185-191 (2011)

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

[illegible]